

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I

PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Dysfunktion, Sauerstoffverbrauch und Ultrastruktur der
Nebenniere im tierexperimentellen Arthritismodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Lesiak

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Dysfunktion, Sauerstoffverbrauch und Ultrastruktur der
Nebenniere im tierexperimentellen Arthritismodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Lesiak

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis	1
1.2 Ätiologie der rheumatoiden Arthritis	1
1.2.1 Genetik.....	1
1.2.2 Exogene Faktoren	4
1.2.3 Lebensweise	5
1.3 Symptome und Krankheitsfolgen der rheumatoiden Arthritis	6
1.4 Rheumafaktoren und Antikörper gegen citrullinierte Proteine	8
1.5 Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	10
1.6 Molekulare Pathomechanismen bei rheumatoider Arthritis	12
1.6.1 Histologie.....	12
1.6.2 beteiligte Entzündungszellen	13
1.6.3 aktivierte synoviale Fibroblasten.....	16
1.6.4 Zytokine	18
1.7 Neuroendokrinoimmunologie der rheumatoiden Arthritis	20
1.7.1 Hypothalamus-Autonomes Nervensystem (HANS)-Achse	21
1.7.2 Neurotransmitter der sensiblen Nervenfasern	22
1.7.3 Geschlechtshormone.....	22
1.7.4 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse	25
1.8 Inadäquate Kortisolsekretion im Verhältnis zum Grad der Entzündung	27
1.9 Zytokinwirkung auf die Steroidogenese	31
1.10 Gegenstand der Arbeit	32
2 Material und Methoden	33

2.1 Materialliste	33
2.2 Arthritisinduktion	34
2.3 Dokumentation des Krankheitsverlaufs	35
2.4 Tötung der Tiere, Organ- und Blutentnahme	36
2.5 O ₂ -Messung	37
2.5.1 Prinzip der O ₂ -Messung.....	37
2.5.2 Vorgehensweise bei der O ₂ -Messung	38
2.6 Corticosteronmessung	40
2.6.1 Prinzip des Enzyme-linked-Immunsorbent Assay.....	40
2.6.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf	41
2.7 CINC-1- & CINC-3-Messung.....	42
2.7.1 Prinzip des Enzyme-linked Immunsorbent Assay	42
2.7.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf	43
2.8 Proteom Profiler	44
2.8.1 Prinzip des Proteom Profilers	44
2.8.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf	45
2.9 Elektronenmikroskopische Auswertung der Fläche des glatten endoplasmatischen Retikulums in Bezug auf die Fläche des Zytoplasmas der Nebenniere	46
2.10 Statistische Analyse	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Klinischer Score und Gewicht im Verlauf der Arthritis	51
3.2 Absolutgewichte und Ratio Nebennierengewicht / Körpergewicht	53
3.3 Plasmacorticosteronkonzentration	55
3.4 Bestimmung der Corticosteron-Sekretion während und nach der O ₂ -Messung am explantierten Organ.....	56
3.4.1 Corticosteron-Sekretion je Versuchstag	56

3.4.2 Corticosteron-Sekretion im Zeitverlauf	59
3.5 Bestimmung der CINC-Sekretion während und nach der O ₂ -Messung am explantierten Organ	62
3.5.1 CINC-1-Sekretion je Versuchstag.....	62
3.5.2 CINC-1-Sekretion im Zeitverlauf.....	68
3.5.3 CINC-3-Sekretion je Versuchstag.....	71
3.5.4 CINC-3-Sekretion im Zeitverlauf.....	77
3.6 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren im Verlauf der experimentellen Arthritis	80
3.6.1 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren je Versuchstag	80
3.6.2 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren im Zeitverlauf	86
3.7 Zytokinprofil der explantierten und stimulierten Nebennieren (Proteom Profiler)	89
3.8 Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder	93
4 Diskussion	94
4.1 Score und Gewichtsverlauf	94
4.2 Verhältnis des Nebennierengewichts zum Körpergewicht	95
4.3 Plasmacorticosteronkonzentration	97
4.4 Corticosteron-Sekretion am explantierten Organ	99
4.5 Proteom Profiler: CINC & Neutrophile.....	105
4.6 Sauerstoffverbrauchsmessung	109
4.7 Elektronenmikroskopie.....	112
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	115
Literaturverzeichnis	116
Abbildungsverzeichnis	136
Selbstständigkeitserklärung.....	139
Danksagung	140

Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD 2 = 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2

ACPA = anti citrullinated protein/peptide antibodies / Antikörper gegen citrullinierte Proteine/Peptide

ACTH = Adrenocorticotropes Hormon

BMI = body mass index

BSA = bovines Serumalbumin

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CD = cluster of differentiation

CIA = collagen-induced arthritis

CINC = cytokine-induced neutrophil chemoattractant

COX = Cyclooxygenase

CRH = Corticotropin releasing hormone

Cxcl1 = C-X-C motif chemokine ligand 1

CXCR = C-X-C chemokine receptor

DHEA = Dehydroepiandrosteron

DHEAS = Dehydroepiandrosteronsulfat

DMARD = disease-modifying anti-rheumatic drugs

EBV = Epstein-Barr-Virus

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

GBM = glomeruläre Basalmembran

HANS-Achse = Hypothalamus-Autonomes Nervensystem-Achse

HDL = high density lipoprotein

HLA = human leukocyte antigen

HPA-Achse = Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland-Achse

HRP = horseradish peroxidase

i.m. = intramuskulär

IFN- γ = Interferon gamma

IgG/M/A = Immunglobulin vom Typ G/M/A

IL-1 β = Interleukin 1- β

IL-6 = Interleukin 6

LPS = Lipopolysaccharid

MHC = major histocompatibility complex

MIP-2 = macrophage inflammatory protein 2

mRNA = messenger ribonucleic acid

NF- $\kappa\beta$ = nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells

NO = Stickstoffmonoxid

NSAID = Nichtsteroidale Antirheumatika

OA = Osteoarthritis

p 53 = Protein 53

PADI4 = Peptidyl-Arginin-Deiminase 4

PBS = phosphate buffered saline

PGE2 = Prostaglandin E2

PGI2 = Prostaglandin I2 / Prostacyclin

RA = rheumatoide Arthritis

RANKL = receptor activator of NF- $\kappa\beta$ ligand

rpm = rounds per minute

s.c. = subcutan

sER = smooth endoplasmic reticulum

SLE = systemischer Lupus erythematodes

sRANKL = soluble RANK Ligand

StAR = steroidogenic acute regulatory protein

TH1 = T-Helferzellen der Subgruppe 1

TLR = toll-like receptor

TNF = Tumornekrosefaktor

VEGF-D = vascular endothelial growth factor D

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung, in erster Linie der Gelenke, mit einer Prävalenz von ca. 1% (1). Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Prävalenz auf bis zu 2%. Die höchste Erkrankungsrate liegt zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr. Die RA betrifft vor allem das weibliche Geschlecht (Verhältnis ♀:♂ wie 2-3:1) (2). Die mittlerweile erhöhte Diagnoserate könnte mit erhöhtem Augenmerk auf die Krankheit und besseren diagnostischen Möglichkeiten zusammenhängen (2). Die RA ist die häufigste chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, deren Auftreten eine geographische Besonderheit aufweist (3). Die medianen Inzidenzraten sind in Südeuropa (3,3-3,5/100.000) geringer als in Nordeuropa oder Nordamerika (5-10,7/100.000) (4). Weitere Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sind Spondylarthritiden, die v.a. am Achsenskelett chronisch-entzündlich verlaufen (z.B. Morbus Bechterew), Kollagenosen, welche sich hauptsächlich an Bindegeweben, Muskulatur und inneren Organen niederschlagen und primäre Vaskulitiden, die mit Entzündungen der Gefäße und Mitbeteiligung innerer Organe einhergehen (5).

1.2 Ätiologie der rheumatoiden Arthritis

1.2.1 Genetik

Es besteht eine familiäre Häufung der RA und eine positive Korrelation zu gewissen Genkonstellationen. Die Erbllichkeit der RA ist nicht abschließend geklärt. Eine dänische Studie beziffert die Erbllichkeit der RA auf ca. 12% (6). Eine andere Studie von MacGregor et al. geht von einer Erbllichkeit von ca. 60% aus (7). Bestimmte Allele, die mit RA assoziiert sind, kommen in Südeuropa seltener vor (4). Die familiäre Risikorate für die Entwicklung einer RA beträgt ca. 3 unter erstgradig Verwandten und 2 unter zweitgradig Verwandten (8). Bei frühem Krankheitsausbruch des betroffenen Familienmitglieds und Seropositivität für Rheumafaktoren und ACPA (Antikörper gegen citrullinierte Proteine/Peptide) erhöht sich die Chance, zu erkranken. Familiäre Faktoren gewichten schwerer bei seropositiver als bei seronegativer RA (8). In dieser schwedischen Studie beträgt die Erbllichkeit für ACPA-negative RA ca. 20% und für ACPA-positive RA ca. 50% (8). Kurko et al. gehen davon aus, dass HLA-Allele, und

das damit assoziierte sog. shared epitope-Phänomen, für 37% der Erbllichkeit verantwortlich sind (9). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass dieser Effekt überschätzt wurde und es auch protektive Allele gibt (9). MHC-Gene kodieren für Haupthistokompatibilitätsantigene (HLA), deren Aufgabe es ist, bestimmte Antigene nach deren Prozessierung den T-Zellen zu präsentieren. Mit RA assoziierte HLA-Moleküle sind HLA-DR-10 (DRB1*1001), HLA-DR-4 (DRB*0401) und HLA-DR1 (DRB1*0101) (10). Der HLA-DR-4 Serotyp ist beispielsweise unter RA-Patienten weiter verbreitet als unter gesunden Kontrollpersonen. Diese Proteine präsentieren durch das sog. shared-epitope ähnlich aufgebaute Peptidfragmente. Das shared-epitope ist eine gemeinsame, sehr ähnliche Aminosäuresequenz in der dritten hypervariablen Region der β -Kette dieser präsentierenden Proteine (10). Eine genomweite Assoziationsstudie zeigte, dass die AS-Sequenzen QKRAA/QRRAA/RRRAA an Aminosäurestelle 71-74 (shared-epitope) mit einer Suszeptibilitätserhöhung assoziiert sind (11). Das shared-epitope präsentiert möglicherweise bestimmte Peptidfragmente bevorzugt, die vom T-Zell-Rezeptor als (Auto)antigen erkannt werden, oder wird direkt selbst zum Aktivator des T-Zell-Rezeptors (10). In einer Zwillingsstudie wurde eine erhöhte Konkordanz für RA für shared-epitope-Positivität (relatives Risiko 3,7) festgestellt. Zwillinge, welche homozygot für ein shared epitope Allel waren, waren von einem fünffach erhöhten RA-Risiko betroffen, wenn man mit Zwillingen ohne shared epitope-Allel verglich (12). Es besteht eine Assoziation zwischen den shared-epitope-Allelen und dem Vorkommen von ACPA (11).

Ein Grund für eine bis dato so erfolgreiche Selektion von HLA-DRB-1*04 könnte sein, dass dieses Allel davor schützt, ein hämorrhagisches Dengue-Fieber zu entwickeln. Homozygote Träger dieses Allels sind 11,6fach seltener von Dengue-Fieber betroffen als Individuen, die kein solches Allel besitzen (14).

Eine niederländische Forschungsgruppe entdeckte die protektiven Allele HLA-DRB-1*0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302 und *1304, die für die gemeinsame AS-Sequenz DERRAA kodieren (15). Diese wirken signifikant protektiv hinsichtlich der röntgenologischen Gelenk-Zerstörung. Dieser protektive Faktor tritt nur in Kombination mit prädisponierenden Allelen, Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPA) oder dem Risikofaktor Rauchen auf. Bei Patienten ohne diese Prädispositionen, die

trotzdem eine RA entwickeln, ist der schützende Effekt dieser DERAA-Sequenz nicht bewiesen (15).

Genomweite Assoziationsstudien, welche bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) untersuchten, brachten weitere für RA prädisponierende Gen-Loci zum Vorschein. Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PADI4), Proteine Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22 (PTPN22), Tumornekrosefaktor alpha-induziertes Protein 3 (TNFAIP3), C-C motif chemokine receptor type 6 (CCR6) und viele weitere SNPs wurden vermehrt bei RA-Patienten gefunden (11) (16). Durch diese Art der Studie ist aber weder die tatsächliche Kausalität des Genprodukts für die Erkrankung bewiesen, noch die genaue Auswirkung der abgeänderten Aminosäuresequenz verstanden (z.B. Stop-Codon, Frame-Shift-Mutation), es werden lediglich Auflistungen von Risiko-Loci generiert (11).

Das Genprodukt von PADI4, ein Mitglied der Peptidyl-Arginin-Deiminase-Familie, ist ein Enzym, welches Arginin posttranslational zu Citrullin modifiziert (11). Die physiologische Bedeutung hierfür ist noch nicht verstanden. Transkripte dieses Risiko-Haplotyps sind stabiler als die Nicht-Risiko-Haplotypen des Enzyms PADI4 und die damit einhergehende Funktionserhöhung könnte zu Autoimmunreaktionen gegen citrullinierte Peptide führen (11). Dieser Risiko-Haplotyp ist darüberhinaus mit ACPA-Positivität assoziiert. In der Folge entstehende citrullinierte Peptide binden mit höherer Affinität an shared-epitope Moleküle, werden prozessiert und sind immunogen (16). PADI4 wird in hämatologischem und synovialen Gewebe von RA-Patienten exprimiert (17). Alle genetischen Faktoren zusammen erklären nur ca. 16% der totalen Suszeptibilität (16). Schätzungen besagen jedoch, dass SNP, die bei genomweiten Assoziationsstudien bei RA gefunden wurden, für ca. 20% des Risikos eine RA zu entwickeln verantwortlich sein könnten (18). Erwähnenswert ist, dass trotz der immer größer werdenden Erkenntnis über genetische Risikofaktoren nicht alle genetisch prädisponierten Individuen eine RA entwickeln (19).

1.2.2 Exogene Faktoren

Bei der Suche nach krankheitsauslösenden Ursachen wird immer wieder auch der Einfluss externer Mikroorganismen diskutiert. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann bekannterweise die B-Zell-Proliferation anregen und somit positiv zur Produktion von Autoantikörpern und Rheumafaktoren beitragen (19). Autoantikörper können mit dem EBV nuclear antigen kreuzreagieren. Aufgrund der hohen Seroprävalenz von EBV zeigen Studien oft eine Koexistenz von EBV und RA. EBV wird oft in der Synovialis von RA-Patienten nachgewiesen, bei Osteoarthritis jedoch nicht (19) (20).

Ein anderes Virus, welches mit dem Auftreten von RA assoziiert ist, ist der Erreger der Ringelröteln (Erythema infectiosum), Parvovirus B19. Es ruft eine kurzlebige Arthropathie hervor, die klinisch der RA ähnelt. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Arthritis einer akuten Parvovirus B19-Infektion folgen kann (19). Auf die Beobachtung hin, dass Tetracyclin-Gabe eine Besserung der RA erreicht, wurde eine Beteiligung von Mycoplasmen diskutiert. Jedoch hat das Antibiotikum die intrinsische Eigenschaft Metalloproteinasen zu inaktivieren und einen antizytokinartigen Charakter. Viele kultur- oder PCR-basierte Experimente waren zudem unbemerkt mit Mycoplasmen kontaminiert (19). Mykobakterien kamen durch die histologische Ähnlichkeit der RA mit tuberkulöser Skeletterstörung und aufgrund des Wissens, dass einige Mykobakterien-Gattungen arthritisinguzierend sind, in den Fokus der Aufmerksamkeit. Tiefergehende Untersuchungen hierzu konnten sowohl in Kultur als auch molekular nicht beweisen, dass Mykobakterien ein biologischer RA-Auslöser sind (19).

Molekulare Mimikry wird zwischen dem Hämolysin-Protein von *Proteus mirabilis* und prädisponierenden HLA-Genprodukten als Auslöser für RA gesehen. Die ähnlichen AS-Sequenzen der beiden Moleküle sollen die Verbindung zwischen Infektion und Autoimmunreaktion herstellen. Bis heute wurde kein Beweis erbracht, dass es eine Korrelation zwischen einer Proteusinfektion und RA gibt (19) (21). Die Ergebnisse der Studien, die nach infektiösem Hintergrund der RA suchen, sind skeptisch zu betrachten. Die RA selbst oder deren immunsuppressive Behandlung kann zur Infektion führen, die dann im Nachhinein nachgewiesen wird. Die reine Detektion fremder Organismen in der Synovialis stellt nicht die aktive Beteiligung dieses Organismus an der Pathogenese dar (19). EBV kann als Parasit in B-Zellen passiv mit in die Synovialis einwandern und wird dort beim Screening entdeckt. Es gibt weiterhin

keinen überzeugenden Beweis, dass ein einzelnes Agens eines Mikroorganismus RA auslöst (19).

1.2.3 Lebensweise

Die systemische Gelenkerkrankung verläuft in südlicheren Ländern milder und mit weniger extraartikulären Manifestationen, wobei Umweltfaktoren und der mediterrane Lebensstil, z.B. die Ernährungsweise, einen möglicherweise protektiven Effekt auf die Krankheitsentwicklung und –aktivität ausüben (4).

Tabakrauch nimmt erheblichen Einfluss sowohl auf die Inzidenz, als auch auf die Krankheitsaktivität. Nach Berichtigung der Datensätze mit Einflußfaktoren wie Alter, Wohnort, Familienstand, soziale Schichtzugehörigkeit und BMI verblieb das relative Risiko einer finnischen Kohorte für Männer eine seropositive RA zu entwickeln für Ex-Raucher bei 2,6 und für gegenwärtige Raucher bei 3,8 verglichen mit Nicht-Rauchern (22). Auch bei postmenopausalen Frauen in den USA konnte das relative Risiko für gegenwärtige Raucherinnen auf 2,2 und für frühere Raucherinnen, die in den letzten 10 Jahren aufhörten zu rauchen, auf 1,3 beziffert werden (23).

Die molekularpathologischen Erklärungen für die Zusammenhänge sind im Detail nicht bekannt (23). Jedoch zeigte eine Studie unter Rauchern erhöhte Konzentrationen an PADI-Enzymen (Peptidyl-Arginin-Deiminase) in Bronchiallavageflüssigkeit verglichen mit Nicht-Rauchern (24). Diese Enzyme sind verantwortlich für die Citrullinierung von Proteinen und somit der Entstehung von Autoantigenen. Trifft der Faktor Tabakrauch auf shared-epitope-Allele, beträgt das relative Risiko zu erkranken bei einem Allel 7,5, bei zwei Allelen sogar 15,7 im Vergleich zum relativen Risiko bei einem Allel ohne Tabakrauch von 2,8. Dieser Zusammenhang besteht nur bei seropositiver RA (25). Je ausgeprägter der Tabakkonsum ist, desto höher ist das Risiko zu erkranken (26). Mehr als 20 packyears sind signifikant assoziiert mit dem Auftreten von Rheumaknoten, verminderter Griffstärke, vermehrter Gelenkdestruktion und röntgenologischen Erosionen an den betroffenen Gelenken (27) (28). Es besteht ein signifikanter Gradient von Nicht-Rauchern über Ex-Raucher zu Noch-Rauchern bezüglich der Gelenkaffektion und -schmerzen (29).

In ähnlicher Weise wie Tabakrauch führt Übergewicht dazu, vermehrt RA zu entwickeln. Bei prämenopausalen Frauen trägt ein Body-Mass-Index (BMI) > 25,8 zu dem Risiko eine RA zu entwickeln eine Odds-Ratio von 1,5 verglichen mit

Kontrollpersonen bei (30). Ist der BMI > 30, beträgt die Odds Ratio bei Frauen 4,96 und bei Männern 1,15 (31). Zwischen 1985 und 2007 hat die RA-Inzidenz um 9,2/100.000 zugenommen, wobei 4,8/100.000 (=52%) auf Übergewicht zurückzuführen sind. Ausschlaggebend ist nicht das Übergewicht zum Inzidenzzeitpunkt sondern das Übergewicht im bisherigen Lebenslauf (32).

1.3 Symptome und Krankheitsfolgen der rheumatoiden Arthritis

Die RA zeigt oft einen typischen Symptomenkomplex, beginnt aber zunächst mit unspezifischen Systemreaktionen wie Müdigkeit, Hypertranspiration und subfebrilen Körpertemperaturen. Neben diesen Allgemeinreaktionen können Myalgien, brüchige Nägel, ein Palmarerythem und die typische Morgensteifigkeit, die v.a. an Finger- und Fußgelenken länger als 30 Minuten andauert, vorkommen (2) (5).

Der Gelenkbefall manifestiert sich klassisch zunächst oft symmetrisch an den kleinen Hand- und Fußgelenken. Hier sind v.a. die Grund- und Mittelgelenke betroffen. Betroffene Fingerendgelenke sind nahezu ein Ausschlusskriterium für die Diagnose einer RA. Im weiteren Verlauf kann sich die RA auf Knie-, Hüft-, Hand-, Ellenbogen- und Schultergelenke ausbreiten. Eine Mitbeteiligung der Halswirbelsäule, auch die fünfte Extremität des RA-Patienten genannt, tritt manchmal bei RA auf, wobei Brust- und Lendenwirbelsäulenabschnitte nahezu nie betroffen sind (5). Die Gewebedegeneration erreicht ihren Höhepunkt in Muskelatrophien, Fehlstellungen, Funktionseinbußen, Sehnenrupturen und Ankylosen. Besonders atlantoaxiale Subluxationen mit okzipitalen Schmerzen, neurologischen Symptomen (Parästhesien, motorische Störungen und Inkontinenz) und im Extremfall Querschnittslähmung können auftreten (5) (33).

Die Hände sind die Erkennungsmerkmale der RA-Patienten, da diese oft die charakteristischen Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten, gepaart mit einer Ulnardeviation der Finger, aufweisen (5) (34). Sehnen und Schleimbeutel sind in der frühen Klinik oft mitbetroffen (34). Extraartikuläre Manifestationen der RA sind mannigfaltig und reichen von Mitbeteiligung der Blutgefäße (höheres Atherogenese- und Schlaganfallrisiko) über Knochenfrakturen, Herz- und Nierenbeteiligung, Xerostomie, Insulinresistenz, Augen- und Lungenbeteiligung bis hin zur Amyloidose (35). Oft beobachtete extraartikuläre Manifestationen sind die subkutanen

Rheumaknoten, die v.a. streckseitig an den Extremitäten vorkommen (35). Zusätzlich zur Immobilität und den Körpermissempfindungen im Krankheitsverlauf, ist auch die Mortalität der RA-Patienten in den letzten Jahren gleichgeblieben, wohingegen die der Normalbevölkerung abnahm. Somit entstand ein noch größerer Unterschied in der Überlebenszeit zwischen diesen beiden Gruppen (36).

Dazu ist das Risiko für ischämische Herzerkrankungen bei Personen mit RA signifikant höher als bei gesunden Kontrollpersonen. Es besteht ein sechsfach erhöhtes Risiko für einen stillen Herzinfarkt und ein ca. dreifach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt mit Krankenhausaufenthalt (36). Weitere Begleiterscheinungen sind ein schlechteres Outcome von Rheumatikern bei kardialen Erkrankungen wie beispielsweise der Herzinsuffizienz (37). Verglichen mit Kontrollpersonen haben RA-Patienten ein knapp doppelt so hohes Risiko an kongestiver Herzinsuffizienz zu erkranken, unabhängig von allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren oder ischämischer Herzerkrankung (38).

Viele der Begleiterscheinungen sind durch Entzündungsmediatoren oder Immunkomplexe bedingt (35). RA-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf sind susceptibler für Infektionen aller Art. Die Infektionsinzidenz ist bei Rheumatikern ca. 2,5fach gegenüber der Normalbevölkerung erhöht, wobei dieser Effekt kausal nicht ausschließlich der immunsuppressiven Medikation zuzurechnen ist (1). Insgesamt sind RA-Patienten mit einer Reduktion der Lebenserwartung von im Durchschnitt 6-7 Jahren belastet (39). Vorrangig sind hierfür kardiovaskuläre, infektiöse, hämatologische, gastrointestinale und pulmonale Erkrankungen verantwortlich (1) (40). Einige Patienten leiden unter sog. rheumatoider Kachexie (41) (42) und dem Chronic-Fatigue-Syndrom, welches durch schlechten Schlaf, Depression, Schmerz, verminderter sozialer Unterstützung und Übergewicht zu körperlicher Inaktivität führt (43) (44). Dieses Syndrom nimmt wiederum Einfluss auf das Befinden und ist signifikant mit körperlichen und psychischen Symptomen assoziiert (44).

Psychologisch erfahren die Betroffenen durch veränderte soziale Rollen eine andere, neue Teilhabe an der Gesellschaft und müssen z.B. schmerzbedingt bekannte Lebensweisen aufgeben, worauf oft Depression und verminderter Selbstwert basiert (1) (45). Der chronische Charakter der Krankheit ohne Aussicht auf Heilung mit fortschreitenden physischen Einschränkungen, Dauerentzündung und Schmerz ist ausschlaggebend für das erhöhte Depressions- und Angstrisiko. So zeigte eine

taiwanesisches Studie ein bis zu 74% erhöhtes Risiko für Depression im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung (46). Entzündungsmediatoren werden mit der Entwicklung und Entstehung von Depressionen in Verbindung gebracht, weswegen bei vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen depressive Phasen steter Begleiter sind (46) (47). Die kontinuierliche Behandlung der Inflammation, Verhinderung der Gelenkzerstörung und Kosten für den Ersatz bereits beschädigter Gelenke ziehen immense Kosten nach sich. Indirekt entstehen durch Arbeitsunfähigkeit, verminderte Produktivität und Frührente weitere Kosten (48).

1.4 Rheumafaktoren und Antikörper gegen citrullinierte Proteine

Rheumafaktoren sind Autoantikörper vom Typ IgM, IgG oder IgA, welche gegen die CH2- und CH3-Domäne des F_c-Teils des humanen IgG gerichtet sind (3) (33) (49) (50). Ungefähr 80% der RA-Patienten sind seropositiv für Rheumafaktoren (33). Rheumafaktoren korrelieren mit verstärkter Krankheitsaktivität, schlechterer Gelenkfunktion, vermehrten extraartikulären Manifestationen und erhöhter Mortalität. Bei dauerhaft seropositiven Patienten muss öfter auf Zweitwahl-Medikamente zurückgegriffen werden im Vergleich zu Patienten, die seronegativ sind oder nur zu manchen Zeitpunkten seropositiv für Rheumafaktoren. Besonders IgA-Rheumafaktorpositivität innerhalb der ersten drei Krankheitsjahre stellt sich als prognostisch ungünstig hinsichtlich der Krankheitsschwere dar (51) (52).

Die pathologische Rheumafaktorproduktion ist ursächlich ungeklärt, vermutet werden aber eine chronische Stimulation des Immunsystems (z.B. bei Hepatitis C-Infektion), eine Clearance-Funktion, um Immunkomplexe aus dem Blut zu befördern, oder um zur Antigenpräsentation bei Infekten zu dienen. Die Produktion könnte auch durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) durch Aktivierung polyklonaler B-Zellen stimuliert werden (50). In einer Metaanalyse von Nishimura et al. wurde eine Sensitivität von 69% und eine Spezifität von 85% für Rheumafaktoren publiziert (53). Ihre physiologische Wirkung besteht darin, Immunkomplexe via Makrophagen aus der Zirkulation zu eliminieren und die Zytotoxizität von antiviralen Antikörpern und die Parasitenabwehr zu verbessern. Sie potenzieren aber auch die Antigenpräsentation bei dendritischen und B-Zellen gegenüber den T-Zellen (50).

In den letzten Jahren wurden weitere Autoantikörper im Serum von RA-Patienten charakterisiert, welche eine noch höhere Spezifität aufweisen und somit die serologische Diagnostik verbessern (3). Diese Autoantikörper sind gegen Proteine gerichtet, die die Aminosäure Citrullin enthalten (anti citrullinated protein antibodies / ACPA) (54). Sie fließen zusammen mit den Rheumafaktoren in den Unterpunkt Serologie der RA-Diagnostik mit ein. Rheumafaktoren sollten immer in Verbindung mit ACPA betrachtet werden, um deren Aussagekraft zu erhöhen, da sie nicht nur bei RA gefunden werden, sondern auch bei anderen Erkrankungen oder sogar bei Gesunden (ca. 4% unter Kaukasiern) (50). Da ein stärkerer Zusammenhang für ACPA als für IgM Rheumafaktoren im Hinblick auf radiologische Krankheitsprogression gefunden wurde und die Spezifität bei ACPA bei 95% liegt, müssen diese heute immer serologisch bestimmt werden (53).

Die Citrullinierung von Antigenen, um ACPA zu erhalten, erfolgt über die o.g. PADI-Enzyme, wodurch bei der Deiminierung von Arginin zu Citrullin eine leichte Massenänderung und der Verlust einer positiven Ladung im entsprechenden Protein entsteht (55). Die Folge könnten Änderungen in der Interaktion mit anderen Proteinen sein (55). Für die Aktivierung dieser Schlüsselenzyme der Citrullinierung werden Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen benötigt, welche unter physiologischen Bedingungen im Zytosol und Nukleoplasma nicht gegeben sind. Die Autoantigene entstehen durch entzündliche Gewebedestruktion und dessen Reparatur und Wiederaufbau (Abbildung 1) (56). Die entzündete Synovialis bietet ein pathologisches Mikromilieu, wodurch der Sauerstoffmetabolismus ein Ungleichgewicht erfährt. Zum einen werden reaktive Sauerstoffradikale generiert, zum anderen entsteht eine lokale Hypoxie, die Mikroinfarkte im Synovialgewebe verursachen kann (57). Dort bilden sich Plaques mit extrazellulärem Fibrin. PADI2 positive Makrophagen und PADI4 positive Granulozyten gehen an der Stelle des Geschehens aufgrund oxidativen Stresses unter (Abbildung 1) (57). Während der Apoptose oder Nekrose wird die PMCA, eine Ca^{2+} -Pumpe der Plasmamembran, von Caspasen zerstört und Ca^{2+} strömt ein. Eine Freisetzung von aktivierten PADI-Enzymen folgt (55). Potentielle Proteine für die Citrullinierung sind Fibrinogen, α -Enolase, Vimentin, Kollagen Typ II u.a. (11). Es entstehen die Anti-citrullinierte Protein Antikörper, Anti-perinuclear Factor (APF), Anti-Keratin-Antikörper (AKA), Anti-citrulliniertes Filaggrin-Antikörper (AFA), Anti-citrulliniertes Fibrinogen-Antikörper (ACF) oder Anti-citrulliniertes Vimentin-Antikörper (Anti-Sa-Antikörper)

(Abbildung 1) (55). Viele bekannte Proteine werden durch Zelltod und Apoptose modifiziert und so nicht mehr als körpereigen erkannt. Diese werden dann durch beispielsweise HLA-DRB-1*0401 Proteine erkannt und aktivieren konsekutiv T-Zellen. Die Immunantwort läuft an, ein Circulus vitiosus beginnt (3) (58).

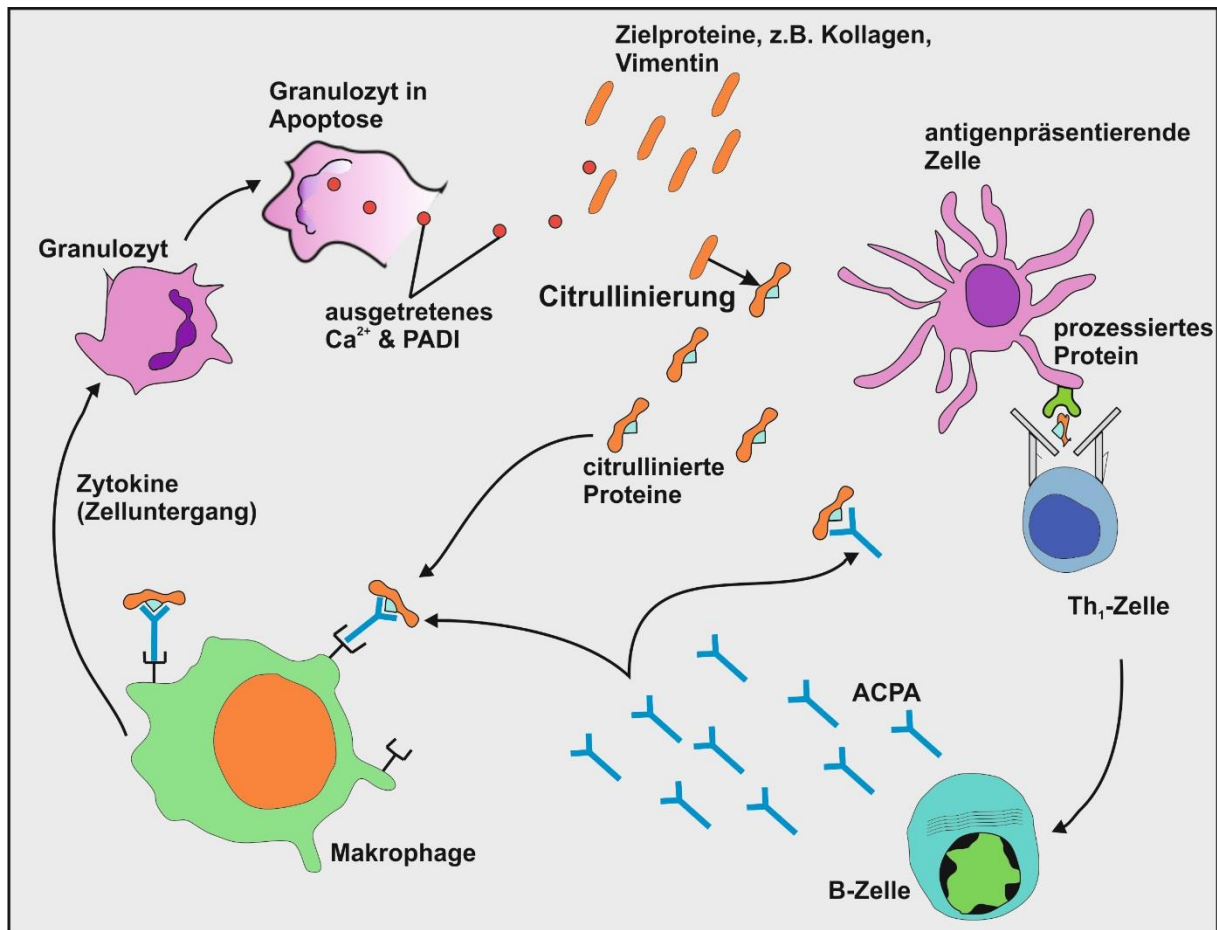


Abbildung 1: Entstehung von citrullinierten Autoantikörpern. Nach Zelluntergang von Granulozyten in entzündetem Gewebe (oder anderen Geweben wie Lunge, Haut, Gingiva) treten durch Ca^{2+} aktivierte PADI-Enzyme (Peptidyl-Arginin-Deiminase) aus dem Zytoplasma aus, welche die Aminosäure Arginin in körpereigenen Proteinen zu Citrullin deiminieren. Die entstehenden (Auto)antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und den T-Helferzellen präsentiert, welche diese dadurch als körperfremd erkennen. Die darauffolgende Induktion von Autoantikörpern gegen die citrullinierten Antigene (ACPA) unterhält die Entzündungssituation. Ein Circulus vitiosus beginnt. Abbildung modifiziert nach Vossenaar et al. (58)

1.5 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Hinsichtlich der Therapie der rheumatoiden Arthritis steht ein breites Feld an verschiedenen Medikamenten zur Verfügung. Auf Basis der Idee *hit hard and early* zur Vermeidung irreversibler Gelenkschäden gelten die Prämissen Symptomlinderung, klinische Remission und Hemmung der radiologischen Progression (2). Hierbei wird das Therapieschema schnell eskaliert, falls sich auf niedrigeren Therapiestufen keine

Besserung einstellt. Um die Patienten mobil zu halten und um Kontrakturen und Muskelatrophien zu vermeiden, kommen physikalische Therapien (Kryo-, Hydro- oder Bewegungstherapie) zum Einsatz (2). Zur Symptom- und Schmerzkontrolle kommen NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) und Coxibe hinzu, die wegen ihres Nebenwirkungsprofils und dem fehlenden Effekt auf den Krankheitsverlauf relativ kurzfristig eingesetzt werden.

Synthetische Glukokortikoide werden überbrückend bis zum Wirkeintritt der DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs) eingesetzt. Darüber hinaus können sie parallel zu DMARDs niedrig dosiert in der Dauertherapie verwendet werden. Diese Abkömmlinge des körpereigenen Kortisols inhibieren die Sekretion der entzündungsfördernden Interleukine, Prostaglandine, NO (Stickstoffmonoxid) und Histamin (59). Sie hemmen Immunzellen und regulieren somit die Immunabwehr (60).

DMARDs sind bei ca. 70% der Patienten wirksam (2). Beispiele hierfür sind Methotrexat, Leflunomid, Cyclophosphamid, Sulfasalazin oder Hydroxychloroquin (2) (61). Das Nebenwirkungsprofil vieler Antirheumatika, das vom Cushing-Syndrom (Glukokortikoide), über GI-Ulcera (NSAR) bis hin zu Teratogenität (DMARDs) bei konzeptionsfähigen jungen Patientinnen reicht, muss bei der Überprüfung der Compliance der Patienten bedacht werden. Fruchtschädigende Metabolite können bei manchen Therapieschemata bis zu 2 Jahre im maternalen Körper verbleiben (2).

Zielgerichtete Therapieansätze entstehen durch den Einsatz von sog. Biologicals. Sie kommen bei schweren Verlaufsformen in Kombination mit o.g. Medikamenten zum Einsatz. In den letzten Jahren werden hierfür v.a. Anti-TNF-Antikörper (z.B. Adalimumab), monoklonale humanisierte Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor (z.B. Tocilizumab) oder IL-1-Rezeptorantagonisten eingesetzt (z.B. Anakinra) (2) (61). Ebenfalls kommen B-Zell depletierende (z.B. Rituximab) und T-Lymphozytensuppressive (z.B. Abatacept) Medikamente zum Einsatz (61). Auf diese Weise können verschiedene Komponenten der Entzündung (z.B. humorale und zelluläre Entzündungsmediatoren) beeinflusst werden (61).

1.6 Molekulare Pathomechanismen bei rheumatoider Arthritis

1.6.1 Histologie

Die gesunde innere Schicht der Gelenkkapsel (Membrana synovialis) bildet histomorphologisch Falten und Zotten und besteht aus zwei Schichten. Von außen gesehen ist die erste Schicht lockeres subintimales Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen, Fettzellen und autonomen und sensiblen Nervenfasern. Die zweite Schicht ist die aus 1-4 Lagen bestehende synoviale Intima, die mit sog. Synoviozyten besetzt ist (62). Typ-A-Synoviozyten (makrophagenähnlich) haben Phagozytoseeigenschaften. Typ-B-Synoviozyten (fibroblastenähnlich) bilden die Bindegewebsmatrix und Teile der Synovialflüssigkeit, v.a. Hyaluronan. Der Rest der Synovialflüssigkeit ist ein Dialysat des Blutes (62).

Bei RA ist die Membrana Synovialis geschwollen und mit Immunzellen entzündlich infiltriert. Ödematöse und gefäßreiche Zotten stellen sich dar, und diese bilden später den Pannus, welcher in den Knorpel einwächst und diesen und den darunter liegenden Knochen beschädigt. Periartikuläre Sehnen und Muskeln werden ebenfalls mitbeschädigt (62). Die Synovialzellen proliferieren oft mit palisadenartiger Anordnung. Es entstehen lokal sogenannte tertiäre Lymphfollikel mit Keimzentren. Plasmazellen infiltrieren das synoviale Stroma, während das Granulationsgewebe, welches durch mesenchymartige Transformation gekennzeichnet ist, proliferiert. Weiterhin entstehen fibrinartige Nekrosen und polymerisiertes Fibrin geht mit Hämosiderinablagerungen im Stroma und in Synovialzellen einher (63).

1.6.2 beteiligte Entzündungszellen

Im Allgemeinen besteht die Inflammation im Gelenk aus einem Konglomerat von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Plasmazellen, Mastzellen, Osteoklasten und den veränderten Synoviozyten (64). Antigenpräsentierende Zellen nehmen Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie über MHC-II-Komplexe den T-Zellen (Abbildung 2). Die T-Zellen mit ihrem korrespondierenden T-Zell-Rezeptor binden das Antigenfragment und werden so aktiviert. Es folgt die Sekretion von IL-2 und anderen Zytokinen, die zu einer klonalen Expansion von T-Zellen beitragen (52). Die T-Zellen exprimieren Oberflächenproteine wie cluster of differentiation 69 (CD69), Tumornekrosefaktor (TNF) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL). CD69 kann Makrophagen, TNF synoviale Fibroblasten und RANKL Osteoklasten aktivieren (52).

Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin 17 (IL-17) werden ebenfalls von T-Zellen sezerniert, wobei letzteres wiederum an der Osteoklastenaktivierung und der darauffolgenden Knochenresorption beteiligt ist (65). IFN- γ aktiviert Makrophagen, welche IL-1, IL-6 und TNF sezernieren. Dies sind die Schlüsselzytokine, welche die synovialen Fibroblasten weiter stimulieren (52). Es entsteht ein Entzündungszustand. Die T-Zellantwort ist TH1- bzw. TH17-vermittelt (66). Die Lymphokin-exprimierenden Zellen sind v.a. CD4⁺ und finden sich perivaskulär und in oberflächlichen Schichten der Synovialis (67).

Sie regen via Membranproteinen die Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) und Matrixmetalloproteinase vom Typ 1 (MMP-1) in Synoviozyten an. Zusätzlich verlieren T-Zellklone aus der Synovialis mit der Zeit die Fähigkeit den Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in Fibroblasten zu induzieren, womit ein Ungleichgewicht hin zu den matrixabbauenden Enzymen entsteht (68).

Die Präsenz autoreaktiver Lymphozyten kommt auch bei Gesunden vor. Bei diesen bricht jedoch keine Autoimmunkrankheit aus, weil die Antigene unter antiinflammatorischen Bedingungen präsentiert werden und so regulatorische T-Zellen generiert werden. In Tiermodellen braucht man zur Auslösung der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA) zusätzlich zu Kollagen Typ II Freund-Adjuvans, welches ein proinflammatorisches Milieu während der Antigenprozessierung und -präsentation schafft.

Die pathogene Rolle der B-Zellen definiert sich durch die Autoantikörperproduktion, die Antigenpräsentation via MHC II-Rezeptor, die Modulation und Aktivierung von T-Zellen, die Zytokin-Produktion und die ektopische Lymphopoese (Abbildung 2) (52) (65). B-Zellen prozessieren Antigene und präsentieren Peptidfragmente auf membranständigen MHC II-Rezeptoren den T-Zellen, welche dadurch aktiviert werden, proliferieren und in einen proinflammatorischen Status gesetzt werden (Abbildung 2) (52). Die Rheumafaktoren unterhalten die B-Zellaktivierung via Beteiligung an der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen, wodurch wiederum die Rheumafaktorproduktion aufrechterhalten wird. Rheumafaktoren aktivieren via Immunkomplexe die Komplementkaskade und unterhalten zusätzlich die Inflammation.

Eine gute Evidenz für die Mitwirkung der B-Zellen an der Pathogenese ist das gute Ansprechen auf B-Zell-depletierende Therapien mit monoklonalen anti-CD20 Antikörpern, z.B. Rituximab (52). In Komedikation zeigten sich signifikante Verbesserungen gegenüber einer Kontrollgruppe mit Methotrexat-Monomedikation. Allerdings zieht diese Art der Therapie bei mehr als 3% innerhalb 24 Wochen schwere Infektionen nach sich (69). Die von B-Zellen produzierten IgG-Rheumafaktoren können Monozyten auf eine Weise aktivieren, die letztere zur PGE₂-Produktion veranlasst. Ebenso wird von Monozyten der mononuclear cell factor (MCF) sezerniert, welcher Synovialzellen konsekutiv zur PGE₂- und Kollagenase-Sekretion anregt, wodurch weitere Gewebedestruktion vermittelt wird (70).

Dendritische Zellen von RA-Patienten produzieren nach Stimulation der toll-like Rezeptoren (TLR) signifikant mehr TNF und IL-6 als dendritische Zellen von Gesunden. TLR-3 und TLR-7 sind in der Synovialis von RA-Patienten verglichen mit Osteoarthritispatienten und gesunden Kontrollpersonen vermehrt exprimiert (71). Diese Rezeptoren verschieben die Zytokinproduktion hin zu IL-12, einem Th1-Zell-Induktor. Dadurch werden TLR-2 und TLR-4 hochreguliert, woraus eine erhöhte Sensitivität der toll-like Rezeptoren resultiert, die Inflammationssituation wird weiter eskaliert (71).

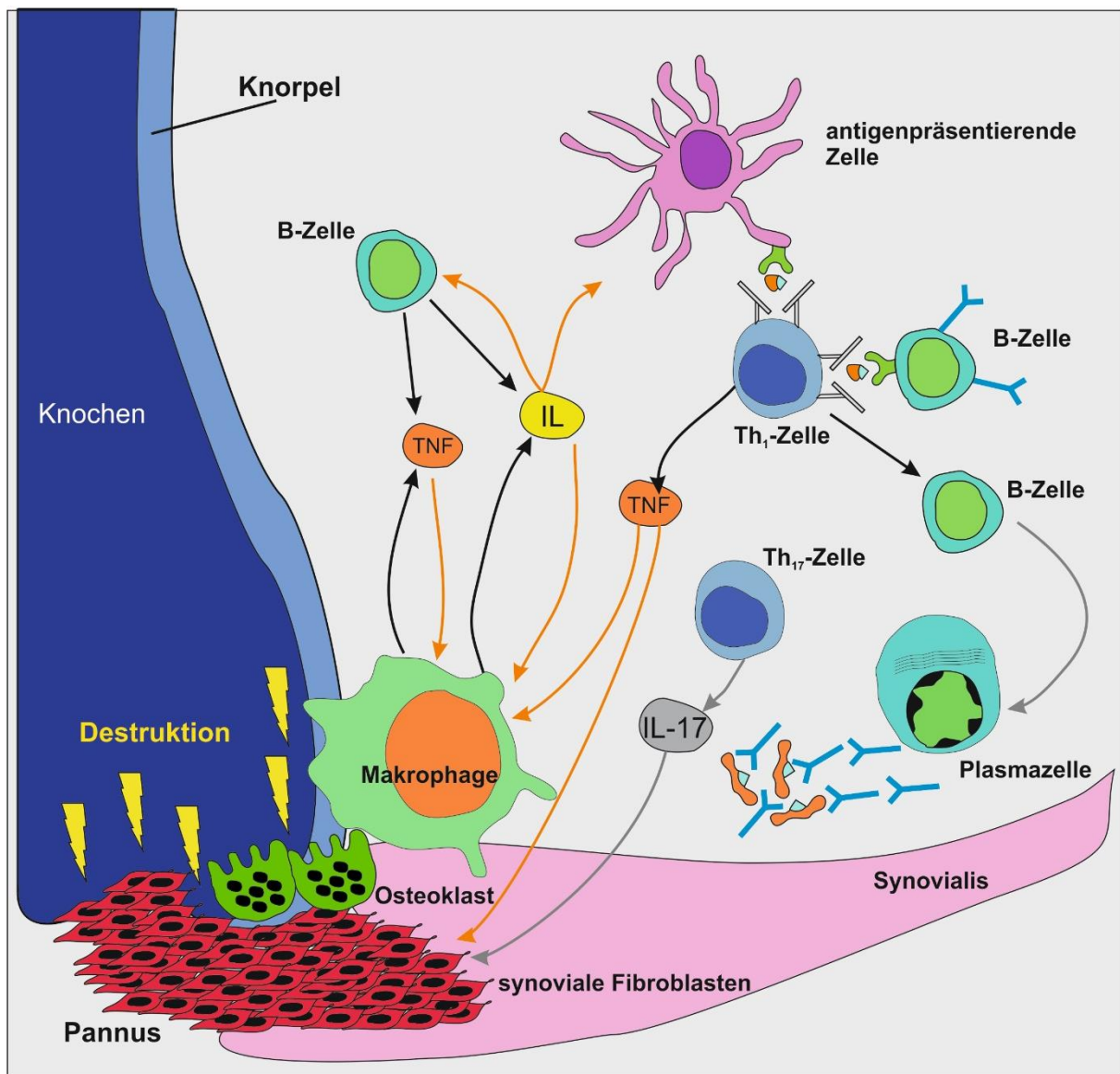


Abbildung 2: Beteiligte Komponenten an der Gelenkdestruktion. Die beteiligten Entzündungszellen sezernieren Zytokine um eine weitere auto- und parakrine Stimulation zu verursachen. (Auto)antigene werden von antipräsentierenden Zellen und B-Zellen prozessiert und den T-Zellen in den Lymphknoten oder lokal im Synovialgewebe in lymphknotenartigen Follikeln (Tertiärfollikel) präsentiert. Hierbei entsteht eine fehlgeleitete Immunantwort, die T-Zellen sezernieren weitere proinflammatorische Zytokine und regen B-Zellen an sich zu Plasmazellen auszdifferenzieren, welche Autoantikörper produzieren. Durch dieses proinflammatorische Milieu werden Fibroblasten der Synovialis aktiviert und degradieren zusammen mit den Entzündungszellen und den Osteoklasten enzymatisch die Knorpel- und Knochenmatrix; Abkürzungen: IL = Interleukine, TNF = tumor necrosis factor; modifiziert nach Egerer et al. (3)

1.6.3 aktivierte synoviale Fibroblasten

Eine bedeutende Rolle in der Knorpeldegradation, noch bevor ein Pannus entsteht, spielen die Synoviozyten, die von der Peripherie des Gelenkknorpels einwandern (Abbildung 2). Diese Zellformationen werden v.a. in der floriden Phase einer akuten rheumatischen Exazerbation beobachtet. Diese Zellen zersetzen zunächst Proteoglykane und schieben sich selbst zwischen die teilweise noch erhaltenen Kollagenfasern (72). Diese sogenannten aktivierten synovialen Fibroblasten können *in vitro* nach IFN- γ -Stimulation MHC-II-Komplexe exprimieren und den T-Zellen Antigene präsentieren (73). Dies ist ein außergewöhnliches Phänomen, da sonst nur antigenpräsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen über MHC-II-Komplexe Antikörper präsentieren können.

Synoviale Fibroblasten von RA-Patienten erreichen mit Makrophagen in Kokultur, wie es im entzündeten Gelenk vorkommt, eine zusätzliche chondrolytische Aktivität (74). Auf fibroblastenartigen Synovialzellen wurde RANKL nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Osteoklastogenese spielen und somit auch als Mediator bei assoziierten Knochenerosionen beteiligt sind (75).

Kotake et al. zeigten, dass RA-Patienten in der Synovialflüssigkeit signifikant größere Mengen an löslichen Proteinen, die den Knochenabbau fördern (RANKL) und signifikant geringere Mengen an knochenprotektiven Osteoprotegrin (OPG) aufwiesen, als Patienten mit anderen Arthropathien. Bildete man die Ratio aus RANKL/OPG, war diese signifikant höher in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten als bei Osteoarthritis, Gicht oder Trauma-Arthritiden und zeigte eine Verschiebung hin zu osteolytischen Faktoren an (75).

Die Kontaktstelle zwischen Pannus und Knorpel ist v.a. mit Makrophagen und synovialen Fibroblasten besetzt, die Metalloproteinasen und Cathepsine für den Knorpelabbau sezernieren (76). Trotz reichlicher reaktiver Nitrogen- und Oxygen-Spezies und zellulärem Stress im Gelenk ist eine komplette Apoptose unter den synovialen Fibroblasten rar (77). Immunhistochemische Analysen zeigen eine Verschiebung hin zu Anti-apoptotischen Proteinen wie B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) und myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) in der Synovialis bei RA-Patienten verglichen mit Osteoarthritis-Patienten (77). Das erschwert die Aktivierung des intrinsischen Apoptosepfads. Der NF- κ B-Signalweg, der in diesen Synoviozyten stark aktiviert ist,

übt einen überlebensfördernden Einfluss auf die Zellen aus und schafft somit eine Verbindung zwischen Entzündung und verminderter Apoptoserate (77). Die Überhöhung der NF- κ B-Aktivität entsteht bei niedriger Expression von Tumorsuppressorgenen, z.B. phosphatase and tensin homolog (PTEN) (77).

Ähnlich zu vielen Tumoren findet sich in der intimalen Synovialis zwar eine Vermehrung des Wächterproteins p53. Dieses ist aber mit funktionell relevanten somatischen Mutationen versehen, die verminderte Apoptoserate wird hiermit begünstigt (77).

Proapoptotische Faktoren, die z.B. durch Hypoxie induziert werden, werden in fibroblastenähnlichen Synoviozyten durch TNF oder IL-1 β inhibiert (78). Dieses Phänomen stellt einen weiteren Bezug zwischen Inflammation und Apoptoseresistenz her (77). Ähnliche Ergebnisse liefert ein Experiment von Müller-Ladner et al., bei dem Fibroblasten aus der Synovialis von RA-Patienten auf gesunden humanen Knorpel verpflanzt wurden. Alle implantierten Fibroblasten zeigten ein intensives, direkt-invasives, nicht-T-Zell-vermitteltes Wachstum in den Knorpel. In allen Implantaten wurden Matrix-degradierende Enzyme wie Cathepsin B, D und L gefunden (79). Lefèvre et al. konnten darüberhinaus zeigen, dass sog. aktivierte synoviale Fibroblasten migrieren können und so weitere Gelenke über die Blutbahn in Mitleidenschaft gezogen werden könnten (80).

1.6.4 Zytokine

Viele Zytokine im Synovialgewebe von RA-Patienten spielen eine pathogenetische Rolle: IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 u.a. werden von makrophagenähnlichen Typ-A-Synoviozyten produziert und können Osteoklasten aktivieren und die Produktion von MMP in Osteoklasten anregen (65). IL-1 β wird vom monozytären System aber auch von vielen anderen Entzündungszellen sezerniert und stimuliert die Freisetzung von MMP aus Fibroblasten und Chondrozyten (76) (81). Transgene Mäuse, welche Genträger für das transmembranäre TNF-Protein sind, entwickeln über die Stimulation der p55TNF- und p75TNF-Rezeptoren eine chronisch inflammatorische symmetrische Arthritis mit Knorpel- und Knochenzerstörung und Einwuchs fibrösen Gewebes (82).

TNF wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert und ist ein entzündungsförderndes Zytokin, das sowohl autokrin als auch parakrin wirkt. Es folgt die weitere Freisetzung von IL-6, IL-8 und GM-CSF, welche allesamt proinflammatorisch wirken (76) (83). TNF-transgene Mäuse, denen man monoklonale Antikörper gegen humanes TNF intraperitoneal injizierte, zeigten keine Anzeichen von Arthritis (84). Die als sogenannte Biologicals eingesetzten Fusionsproteine und Antikörper gegen TNF (z.B. Etanercept, Infliximab, Adalimumab), IL-1 β (z.B. Canakinumab) und IL-6 oder deren Rezeptoren (z.B. Tocilizumab) können die Knorpelzerstörung inhibieren (74).

IL-6 wird von T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten sezerniert (76). IL-6 ist unter anderem autokrin wichtig für das B-Zell-Wachstum (65). Es aktiviert T-Zellen und unterstützt die Reifung von B-Zellen zu Plasmazellen. Es induziert Akute-Phase-Proteine, stimuliert Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und die Proliferation von synovialen Fibroblasten (76).

In der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten sind auch die IL-17-Spiegel im Vergleich zu Osteoarthritis(OA)-Patienten signifikant erhöht (75). Das von CD4-positiven Zellen sezernierte Zytokin IL-17 wirkt stark proinflammatorisch (85). Es werden synergistische Effekte mit TNF in Bezug auf Knochenresorption und Osteoklastendifferenzierung beschrieben (86). Bei Injektion dieses Zytokins *in vivo* in ein Mausgelenk folgte eine Infiltration der Synovialis mit Immunzellen und eine Degradation des Knorpels. Antikörper gegen den IL-17-Rezeptor zeigten im

Experiment bei adjuvant-induzierter Arthritis dosisabhängige Linderung im Sinne einer signifikanten Verbesserung des radiologischen und histologischen Scores im Vergleich zu Kontrolltieren (85). Antikörper gegen IL-17 sind auch bei RA-Patienten bereits im Einsatz (87) (88).

1.7 Neuroendokrinoimmunologie der rheumatoiden Arthritis

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und die Hypothalamus-autonomes Nervensystem-Achse (HANS-Achse) (über den Locus coeruleus im Hirnstamm) sind die beiden Hauptmediatoren in der Antwort auf Inflammation und Stress (Abbildung 3) (89).

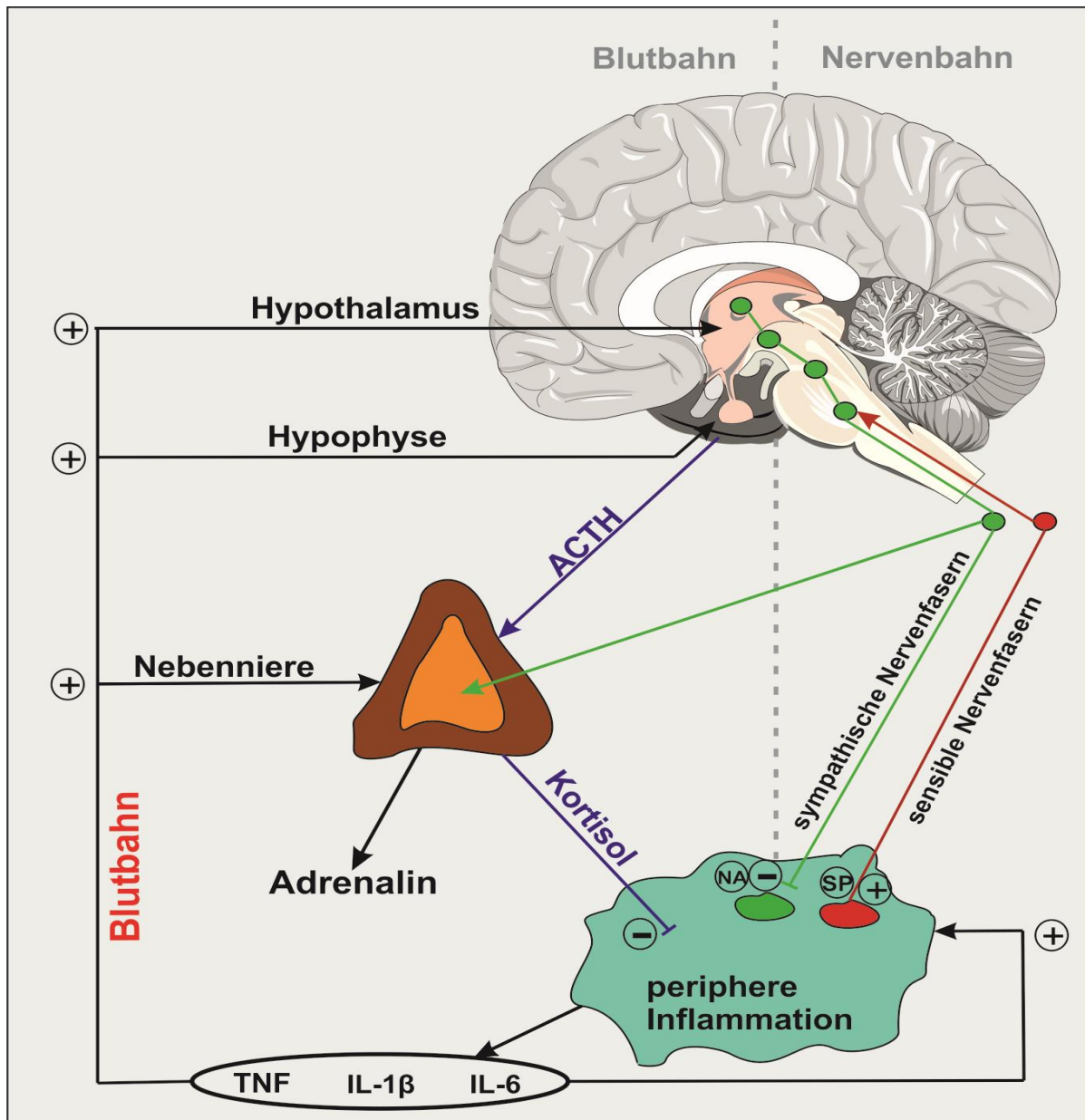


Abbildung 3: HPA- und HANS-Achse während RA. Zytokine (TNF, IL-1 β , IL-6) aus entzündeten Gelenken gelangen über die Blutbahn zu Hypothalamus, Hypophyse und der Nebenniere. Zusammen mit den Informationen der Nervenbahnen, welche das entzündete Gewebe innervieren, wird der Entzündungszustand bewertet und antiinflammatorische Mediatoren wie Kortisol (humoral) oder Noradrenalin (nerval) sezerniert um die Inflammation zu regulieren. Abkürzungen: TNF = tumor necrosis factor; IL = Interleukine; NA = Noradrenalin; SP = Substanz-P; ACTH = Adrenocorticotropes Hormon; Abbildung modifiziert nach Straub et al. (90)

Zentral im Hypothalamus werden die proinflammatorischen Stimuli detektiert (Abbildung 3) und integriert, um rückkoppelnd den Körper vor einer überschießenden Immunantwort zu schützen und ggf. auf einen neuen Stimulus reagieren zu können. Über mindestens drei Wege wird dem Gehirn der Entzündungsstatus übermittelt. Dies sind Lymphozyten im Blut, Zytokine im systemischen Kreislauf und sensible Afferenzen (90). Primär afferente Nervenfasern werden durch chemische, mechanische, thermische und immunologische Stimuli zur Sekretion ihrer Transmitter angeregt. Konsekutiv erfolgt eine Aktivierung der hormonell-nervalen HANS-Achse und der hormonell-hormonellen HPA-Achse.

1.7.1 Hypothalamus-Autonomes Nervensystem (HANS)-Achse

Die HANS-Achse wirkt über Noradrenalin (an β -Adrenorezeptoren) und Adenosin (an A₂-Rezeptoren) antiinflammatorisch (Abbildung 3) (90). Die HANS-Achse wirkt an der Zielzelle entzündungsmildernd über die Bildung von cAMP via β - und A₂-Rezeptorstimulation. cAMP-induzierende Stoffe können, injiziert ins Gelenk, positive therapeutische Effekte hervorrufen. Das Medikament Methotrexat, welches in der Rheumatherapie eingesetzt wird, wirkt niedrig dosiert über die Induktion von extrazellulärem Adenosin, welches an A₂-Rezeptoren bindet und somit intrazelluläres cAMP erhöht (90).

Der nichtselektive Adenosin-Rezeptor-Agonist 5'-N-Ethylcarboxamido-adenosine (NECA) reduziert die IL-1 β -induzierte Kollagenaseproduktion von Synoviozyten signifikant (91). Vor allem der A_{2a}-Rezeptor ist der Rezeptorsubtyp, der die TNF-Produktion von Makrophagen unterdrücken kann (92). Tiere, die den A_{2a}-Rezeptor nicht exprimieren, zeigen vermehrt proinflammatorische Zytokine (93). Ohta et al. schlossen daraus, dass Adenosin am negativen Feedback beteiligt ist, um eine Entzündung zu limitieren und zu terminieren. Ebenso erhöhte die selektive Blockade der A_{2a}-Rezeptoren die durch Entzündung ausgelöste Gewebeerstörung (93).

RA-Patienten zeigten eine signifikant geringere β 2-Adrenorezeptordichte auf CD8⁺ Zellen als gesunde Kontrollen (94). Auch auf den Lymphozyten der Synovialflüssigkeit der RA-Patienten ist die β 2-Adrenorezeptordichte signifikant geringer als auf den peripheren Blutlymphozyten derselben Patienten (94). Die Dichte der sympathischen Nervenfasern ist in der Synovialis von RA-Patienten signifikant geringer als bei Osteoarthritispatienten (95). Die Transmitterkonzentrationen von über β 2-

Adrenozeptoren antiinflammatorisch wirkendem Noradrenalin, Adenosin und endogenen Opioiden aus den sympathischen Fasern sind unverhältnismäßig geringer als die proinflammatorische Substanz-P (SP) aus den sensiblen Nervenfasern (95). RA-Patienten zeigen im Vergleich zu Osteoarthritispatienten eine signifikant geringere Anzahl an Tyrosinhydroxylase-positiven Nervenfasern im Synovialgewebe, welche antiinflammatorische sympathische Hormone produzieren (96). Zusätzlich korreliert die Anzahl der TH-positiven Nervenfasern in RA-Gelenken negativ mit dem Entzündungsindex und den IL-6-Spiegeln in der Synovialis, bei Osteoarthritis hingegen nicht (96). Der Verlust der sympathischen Nervenfasern entsteht auf dem Boden einer Entzündung, wobei deren Untergang / Rückzug die Inflammation wahrscheinlich weiter unterhält (96).

1.7.2 Neurotransmitter der sensiblen Nervenfasern

Substanz-P-positive Nervenfasern sind bei RA-Patienten in der Synovialis signifikant erhöht gegenüber OA-Patienten (96). SP ist proarthritogen, da es die Sekretion von IL-1 β , IL-8 und TNF stimuliert (96) (97). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) wirkt hingegen antiinflammatorisch über die Inhibition von Th1-Zytokinen, der TNF-Sekretion und der Leukozytenproliferation (95). CGRP-positive Nervenfasern sind im Vergleich zu Osteoarthritispatienten signifikant weniger vorhanden in der Synovialis der RA-Patienten (95). Im Tierexperiment zeigten Levine et al., dass schwer betroffene Gelenke mit hohen Konzentrationen an Substanz-P in den Nervenendigungen einhergehen (98). Substanz-P verursacht pathogenetisch eine Vasodilatation, erhöht die vaskuläre Permeabilität, die Leukozytenanhaftung an Endothel, die Stimulation der Phagozytose von polymorphnukleären Leukozyten und die Mastzelldegranulation (98).

1.7.3 Geschlechtshormone

Neben Neurotransmittern nehmen auch Geschlechtshormone Einfluss auf den Krankheitsausbruch und -verlauf. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Prävalenz von RA bei Frauen im Vergleich zu Männern im Verhältnis 2-3:1 steht (2). Androgene sind natürliche Immunsuppressoren, weswegen die Krankheit wahrscheinlich seltener bei unter 45jährigen Männern auftritt (3). Erniedrigte Konzentrationen an Testosteron, einem Androgen, werden bei männlichen RA-Patienten im Plasma und der Synovialflüssigkeit gefunden (99). Auch nach Stimulation

der Testosteronsynthese durch humanes Choriongonadotropin (hCG) fiel die Testosteronantwort bei den männlichen RA-Patienten signifikant geringer im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen aus (100).

Niedrige Serumdehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS, ein adrenales Androgen)-Spiegel, beobachtet man bei weiblichen und männlichen RA-Patientinnen (99). Der Einfluss dieser geringen Konzentrationen wird auch als Mitursache bei anderen Autoimmunkrankheiten wie bei systemischem Lupus erythematoses (SLE) diskutiert (99). Der Anstieg der RA-Inzidenz während der Menopause macht es wahrscheinlich, dass der Östrogen-/ Progesteronmangel auch eine Rolle in der Pathogenese spielt, da die beiden Hormone die humorale Immunität stimulieren, die zelluläre (Th1) aber supprimieren (99). Die verminderte periphere Dehydroepiandrosteron (DHEA)-Konzentration könnte vor allem bei älteren Personen ein Problem darstellen (101). DHEA ist ein Prohormon für Androgene und Östrogene (Abbildung 4). Ein Mangel dieser Vorstufe könnte konsekutiv zu Androgen- und Östrogenmangel in peripheren Zellen führen (101). Die proinflammatorischen Zytokine stimulieren die Östrogenproduktion aus DHEA über die Induktion der 17- β -Hydroxylase und über die Induktion des Aromatase-Komplexes. Somit wird die Konversion von DHEA in Richtung proinflammatorischer Östrogene befördert (101).

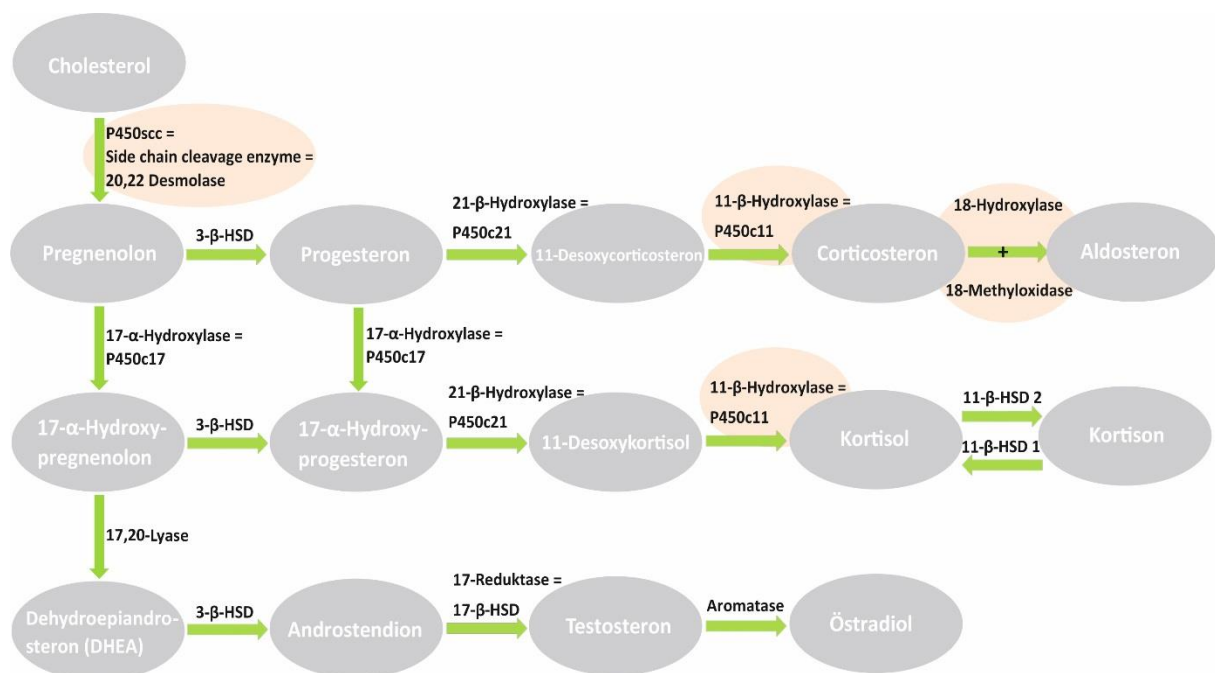


Abbildung 4: Schritte der Steroidhormonsynthese. Rot eingefärbte Enzyme befinden sich im Mitochondrium. Abkürzungen: 3- β -HSD = 3- β -Hydroxysteroiddehydrogenase; 11- β -HSD = 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase; P450 = Cytochrom P450 Enzym; Abbildung nach Schmidt/Lang „Physiologie des Menschen“ (60)

17 β -Östradiol und Progesteron bereiten die Einnistung der Zygote in die Gebärmutterschleimhaut u.a. via Expression von VEGF, β 1-Integrinen und α 5 β 3-Integrinen vor (102). Dieselben beiden letztgenannten Rezeptoren werden von Leukozyten verwendet, um das entzündete Gelenk zu infiltrieren (102). Während des Krankheitsverlaufs beobachtet man ein Östrogenübergewicht gegenüber Androgenen im Synovialgewebe von RA-Patienten verglichen mit Kontrollpersonen (103). Östrogene induzieren diese Rezeptoren und die Neovaskularisation über VEGF (102).

1.7.4 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse

Klassischerweise wird im Hypothalamus das Hormon CRH in den hypophysealen Pfortaderkreislauf ausgeschüttet, worauf die Hypophyse mit einer vermehrten Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) reagiert (Abbildung 5). ACTH gelangt über den systemischen Kreislauf zu dessen Zielorgan, der Nebenniere, um dort die Kortisolsynthese anzuregen (Abbildung 5). CRH kann *in vitro* auch direkt die Kortisolsekretion stimulieren (104). Kortisol ist ein immunsuppressives Hormon und Endpunkt dieser antiinflammatorischen Kaskade. Zwischen der HPA- und HANS-Achse gibt es auf jeder Ebene Querverbindungen, die jeweils Einfluss auf das Stimulationsniveau der anderen Achse nehmen. So kann z.B. CRH über den Locus coeruleus direkt über das sympathische Nervensystem (Nor)Adrenalin zentral und peripher ausschütten (89). Umgekehrt stimuliert das sympathische Nervensystem die Ausschüttung von CRH aus dem Hypothalamus. Es ziehen direkte Nervenfasern vom Locus coeruleus zum Hypothalamus. Es entsteht ein positiver bidirektionaler Feedbackloop (89). IL-6, IL-1 und TNF können als Entzündungsmediatoren die CRH-Produktion anregen (99) (60).

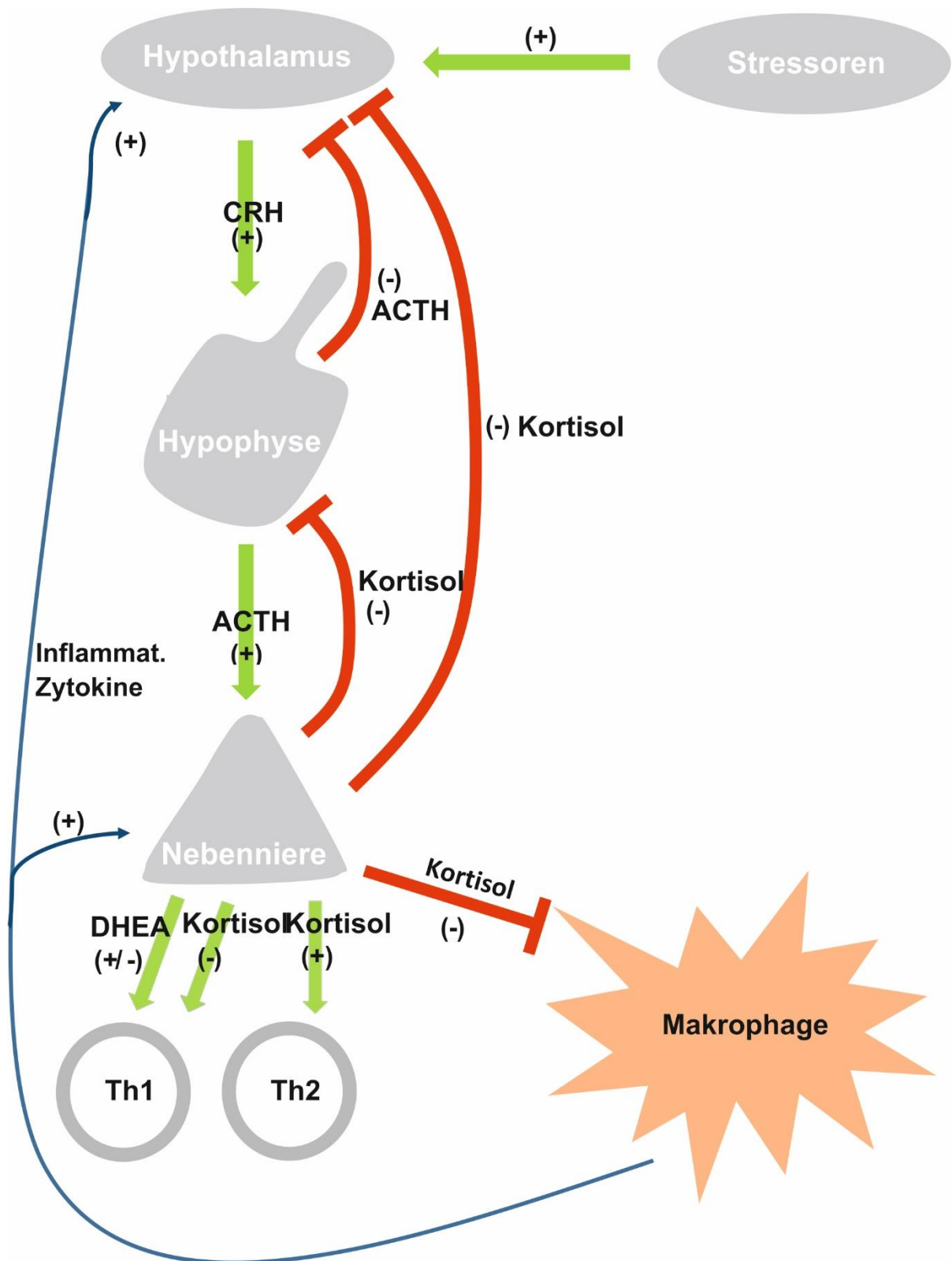


Abbildung 5: schematische Darstellung der HPA-Achse. Kurzfristiger Stress (psychisch und körperlich) und kurzfristig erhöhte Zytokine (TNF, IL-1, IL-6) stimulieren die HPA-Achse auf verschiedenen Ebenen, wodurch CRH (Corticotropin Releasing Hormone), ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und schließlich Kortisol sezerniert werden. Kortisol hat einen direkten Effekt auf Entzündungszellen und kann so Einfluss auf die Inflammation nehmen. Es besteht ein Feedbackmechanismus, wodurch die Informationen aus der Peripherie wieder integriert und neu bewertet werden. Abkürzungen: DHEA = Dehydroepiandrosteron, Th1 = Th1-Helferzelle, Th2 = Th2-Helferzelle; Abbildung modifiziert nach Cutolo et al. (99)

Bei der Beteiligung dieser beiden Kaskaden (HPA und HANS) an der Stressantwort gilt Stress *per definitionem* als komplex-dynamische Situation, in der die normale Homöostase gestört oder bedroht ist (89). Verschiedene Stressoren lösen jedoch unterschiedliche Antwortmuster aus und es gibt erhebliche interindividuelle Antwortmuster, bei denen es zudem zu beachten gilt, dass verschiedene Individuen dieselben Stressoren als unterschiedlich bedrohlich erleben. ACTH stimuliert die Expression mehrerer Enzyme der Steroidhormonbiosynthese und fördert den ersten Schritt, nämlich die Mobilisierung von Cholesterin. CRH und ACTH werden pulsatil mit einer physiologischen Frequenz von 4 Peaks pro Stunde ausgeschüttet (60). ACTH wird weiterhin durch das Antidiuretische Hormon (ADH), Noradrenalin (α -Adrenozeptoren), Angiotensin II, das atriale natriuretische Peptid (ANP), das vasokative intestinale Peptid (VIP), Interleukine, Histamin, Serotonin und Cholezystokinin ausgeschüttet (60). Endorphine können die Sekretion von ACTH hemmen (60). Die Kortisolsekretion unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. Der Sekretionshöhepunkt liegt bei 7 Uhr morgens und fällt während des Tages ab (60).

1.8 Inadäquate Kortisolsekretion im Verhältnis zum Grad der Entzündung

Ein schneller Kortisolanstieg über ein bis maximal zwei Tage nach Beginn einer Infektion wurde evolutionär konserviert, um eine schnelle Immunreaktion zu unterstützen (102). Nach der Detektion eines fremden Antigens durch das Immunsystem startet dieses einen Angriff, bis dieses als nicht körpereigen erkannte Antigen aus dem Organismus eliminiert ist (102). Bei einer Immunreaktion im Rahmen einer Infektion ist nun nach erfolgreicher Eliminierung des Antigens ein hochaktiviertes Immunsystem nicht mehr nötig. Das parallel sezernierte Kortisol reguliert das Immunsystem herunter, wobei die Kortisolkonzentration danach selbst wieder das Ursprungsniveau erreicht. Im Falle einer verlängerten Immunaktivierung wie bei RA werden diese konservierten Mechanismen fehlgeleitet. Ein schneller Abfall des antiinflammatorischen Kortisols und die folgende inadäquate Ausschüttung dieses Hormons sind krankheitsfördernd bei chronisch-inflammatorischen Krankheiten wie RA (102). Die Ratio aus Kortisol/IL-6 und auch die Ratio Kortisol/TNF waren bei unbehandelten RA-Patienten signifikant geringer als bei Kontrollpersonen (105). Je höher die Ratio jeweils war, desto weniger Gelenke waren geschwollen und desto besser war die Griffstärke der betroffenen RA-Patienten. Dasselbe Phänomen war bei

den Ratios aus ACTH/IL-6 und ACTH/TNF zu beobachten (105). Bei ähnlichen chronisch-inflammatorischen Autoimmunkrankheiten wie dem Sjögren's Syndrom und SLE wurden ähnliche Alterationen in der ACTH- und Kortisolausschüttung trotz erhöhter Plasma-IL-6-Konzentrationen gefunden (106). Nach Hüft- oder Knieplastik konnten RA-Patienten keine signifikanten Konzentrationserhöhungen von Kortisol im Blutplasma während der postoperativen Tage zeigen, obwohl die basalen IL-1 β - und IL-6-Konzentrationen stark erhöht waren und nach dem Eingriff noch weiter anstiegen (107). Eine Gruppe von Osteoarthritis-Patienten zeigte hingegen einen signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentration mit einem Sekretionsmaximum nach 48h und normalisierten Werten am dritten Tag post-OP (107). Diese Ungleichheit zeigt, dass RA-Patienten auf diesen Stress-Stimulus nicht ausreichend reagieren können.

Nach exogener CRH-Gabe zeigte sich kein Unterschied in der ACTH- und Kortisolanwort zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen, was für einen stimulusspezifischen Effekt auf die HPA-Achse spricht (107). IL-1 β und IL-6 vermögen im Gegensatz zu CRH die HPA-Achse nicht mehr zu stimulieren. Testet man die Funktion der Adenohypophyse an neu diagnostizierten, noch unbehandelten RA-Patienten, zeigte sich vor und nach Stimulation mit den Releasing Hormonen kein Unterschied in der Plasmakonzentration der Hypophysenhormone ACTH, Prolactin oder Thyreotropin (TSH), und auch nicht des Nebennierenhormons Kortisol, verglichen mit gesunden Kontrollen (108).

Bedenkt man jedoch, dass die RA-Patienten eine chronischen Inflammation aufweisen, sind normale Plasma ACTH- und Kortisolwerte inadäquat niedrig (108). Eine Studie von Eijsbouts et al. zeigte bei basalen ACTH- und Kortisolkonzentrationen zwischen RA-Patienten (in verschiedenen Erkrankungsphasen) und Gesunden keinen Unterschied (109). Die Kortisolproduktion konnte trotz Inflammation wohl nicht erhöht werden (109). Diese Studie untersuchte auch weitere beeinflussende Parameter der Kortisolplasmakonzentration: Es gab keinen Unterschied in der Expression von Kortisol-bindendem Globulin, in der Urinkortisolausscheidung und in der Speichelkonzentration von Kortisol, welche für freies Kortisol steht (109). RA-Patienten nach kürzlichem Krankheitsausbruch oder länger Erkrankte mit aktiver Phase zeigten hingegen signifikant erhöhte IL-6-Spiegel (109).

Bei induziertem Stress durch Hypoglykämie während eines Insulin-Toleranz-Tests erkannte man keinen Unterschied in der ACTH-Konzentration zwischen Gesunden und erkrankten RA-Patienten, wobei die Plasmakortisolkonzentrationen von RA-Patienten jedoch signifikant geringer als die von Gesunden waren (109). Trotz adäquater ACTH-Sekretion konnte keine ausreichende Kortisolantwort aufgebaut werden. Das suggeriert eine Schädigung auf Nebennierenebene (109). Für eine stimulusselektive Adaptation der HPA-Achse spricht auch ein Tierexperiment, bei dem PVG-Ratten mit adjuvanter Arthritis keine Corticosteronsekretion auf leichte Stimulationen wie Injektion hypertoner Salzlösung zeigen konnten, jedoch auf potentiell lebensbedrohliche Stimuli wie LPS-Injektion ein signifikanter Anstieg des Plasmacorticosterons zu beobachten war (110).

Crofford et al. zeigten bei Integration der Plasma-ACTH- und Plasmakortisolwerte über 24h keine Unterschiede zwischen Gesunden und RA-Patienten, obwohl frühmorgens bei Erkrankten die IL-6-Plasmaspiegel gegenüber gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht waren (111). Dies zeigt, dass trotz zirkulierenden Entzündungsmediatoren die HPA-Achse der Inflammation, auf die gesamte Tageszeit betrachtet, nicht entgegenwirken kann (111). Ebenso ist die zirkadiane Rhythmik der Corticosteronsekretion im Tierexperiment von Persellin et al. bei Tieren mit Adjuvant-Arthritis verschoben (112). Gesunde Kontrolltiere zeigten die höchsten Plasmacorticosteronkonzentrationen nachmittags, während arthritische Tiere die Peaks im Durchschnitt sechs Stunden vorher erreichten (112). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte im Tierexperiment mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) zwischen Tag 14 und 41 des Versuchs normale ACTH- und Corticosteron-Blutspiegel trotz erhöhter Nebennierengewichte und weiter ansteigendem IL-1 β (113). Erhöhte Corticosteronwerte an Tag 1 nach Immunisierung normalisierten sich bis Tag 5. Die Ratio aus Corticosteron/IL-1 β war bei Kontrolltieren höher als bei immunisierten Tieren (113). Andere Autoren zeigten, dass trotz signifikanter Hypertrophie der Nebennieren bei Ratten mit experimenteller Arthritis die erkrankten Tiere an Tag 21 eine ähnliche Corticosteronantwort auf ACTH zeigten wie die Kontrolltiere, was einer relativen Insuffizienz entspricht (112).

Ein Tierversuch an arthritischen DA-Ratten, der die zugrunde liegenden Mechanismen der inadäquaten Corticosteronausschüttung im Verhältnis zur Entzündung genauer betrachtete, zeigte keinen Unterschied in der Expression des Scavenger receptor B1

(SR-B1), welcher die HDL-Cholesterolester in die Nebennierenzelle aufnimmt (113). Jedoch war die Menge der Lipidspeicher in der Nebennierenrinde der o.g. Versuchstiere an Tag 28 gegenüber Kontrolltieren und bei arthritischen Tieren an späteren Zeitpunkten (Tag 28-55) gegenüber früheren Zeitpunkten (Tag 5-14) signifikant erhöht, da sie vermindert abgebaut wurden (113). Bei weiterer elektronenmikroskopischer Analyse wurden zwei Arten von Lipidtröpfchen festgestellt: glatte homogene und inhomogene vakuoläre Tröpfchen. Inhomogene Tröpfchen stehen für aktivierte Lipidspeicher, welche dem Lipidabbau unterliegen (113). Homogene Lipidtröpfchen unterliegen keinem Abbau. Die ACTH-Stimulation ging mit vermehrt inhomogenen Strukturen einher, da Cholesterol aus den Speichern freigesetzt wurde (113). Diese inhomogenen Tröpfchen waren bei Kontrolltieren verglichen mit immunisierten Tieren vermehrt, die homogenen Tröpfchen jedoch erniedrigt (113). Zusätzlich wurde in dieser Studie die Ultrastruktur der Mitochondrien, welche die Cholesterolester aus den Lipidtröpfchen aufnehmen, elektronenmikroskopisch untersucht. Bei arthritischen Tieren nahm die Dichte der normalen Mitochondrien ab, während die alterierten Mitochondrien über 55 Tage zunahmen. Die Dichte alterierter Mitochondrien korrelierte negativ mit der Anzahl inhomogener Lipidtröpfchen. Je mehr veränderte Mitochondrien, desto weniger Lipide und Cholesterol wurden aus den Lipidtröpfchen abgebaut (113). Zusätzlich korrelierte die Anzahl normaler Mitochondrien positiv mit den Corticosteronspiegeln im Serum sowohl bei gesunden als auch bei arthritischen Tieren. Bei den arthritischen Tieren korrelierten die homogenen Lipidtröpfchen negativ mit Corticosteronspiegeln (113). Es ist nicht bekannt, ob die Unfähigkeit der Nebenniere mit einer adäquaten Glukokortikoidantwort auf die erhöhten Zytokine bei Entzündung zu antworten ein vorbestehendes Problem ist, welches für RA prädisponiert. Diese Nebenniereninsuffizienz könnte ebenso nach Krankheitsausbruch entstehen und die Krankheit so exazerbieren und perpetuieren. Die Gründe für diese relative, stimulusspezifische (Zytokine) Nebenniereninsuffizienz sind bis dato unbekannt (113) (114).

1.9 Zytokinwirkung auf die Steroidogenese

Nicht nur Hypoxie sondern auch Zytokine, die während Inflammation systemisch zirkulieren, können Enzymschritte der Steroidogenese hemmen (101) (Abbildung 4). In Leydigzellen inhibierte TNF die LH-induzierte Testosteronsekretion um 90% (115). Diese Hemmung findet wahrscheinlich am Anfang der Testosteronsynthese beim Cholesteroltransport über die Mitochondrienmembran statt, da TNF dosisabhängig die mRNA- und Proteinexpression von StAR hemmen kann (115). An Zellkulturen von humanen fetalen adrenalen Zellen beobachtete man, dass TNF die ACTH-induzierte Expressionserhöhung der mRNA der Enzyme der Kortisolsynthese (P450scc, P450c17, P450c11, P450c21) hemmte (116). Ebenso konnte rekombinantes TNF die ACTH-induzierte Kortisolsekretion dieser Zellen dosisabhängig um bis zu 85% hemmen (116). Auch das Zytokin IL-1 β kann Enzymschritte der Steroidhormonsynthese beeinflussen. So konnte IL-1 β die Forskolin-induzierte Testosteronsynthese in Leydigzellen von SD-Ratten stark inhibieren (117). Auch auf adrenaler Ebene bewirkte IL-1 β eine Hemmung der ACTH-induzierten Corticosteronsekretion bei DA-Ratten (113).

1.10 Gegenstand der Arbeit

Grundlagenforschung ist unverzichtbar um weitere neue gezieltere Therapieansätze zu untersuchen, die breiten Nebenwirkungsspektren zu mindern und um einen fundierteren Einblick in die Ätiologie und Pathophysiologie der RA zu bekommen. In dieser Arbeit wird vor allem Bezug auf die körpereigene Kortisolsynthese der Nebenniere genommen. Im engeren Sinne wird der Aspekt der relativen Nebenniereninsuffizienz im Verhältnis zum Schweregrad der Entzündung bei experimenteller Arthritis untersucht. Gründe für diese relative Minderproduktion des entzündungshemmenden Hormons Kortisol sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

Vor allem befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Funktion und der Ultrastruktur der Nebenniere während einer Kollagen-induzierten Arthritis bei DA-Ratten. Der Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurde anhand von klinischen Arthritiscores, Gewicht von Tieren und Nebennieren und Plasmacorticosteronkonzentrationen erfasst. Es wurde zunächst *ex-vivo* die Funktion der Nebennieren mittels Messung des Sauerstoffverbrauchs unter Einfluss von definierten Parametern (IL-1 β und ACTH) gemessen. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass ACTH einen Mehrverbrauch und IL-1 β , als hemmendes Zytokin der Corticosteronsynthese, einen Minderverbrauch von Sauerstoff induziert. Zusätzlich wurden Corticosteronausschüttung und Zytokinprofil der Nebennieren untersucht.

Des Weiteren beschäftigte sich diese Arbeit mit dem quantitativen Verhältnis von glattem endoplasmatischem Retikulum, in dem Schritte der Corticosteronbiosynthese stattfinden, in Relation zum Zytoplasma von *Zona fasciculata*-Zellen. Zur Klärung der Frage ob CIA Veränderungen in der quantitativen Zusammensetzung der steroidproduzierenden Zellorganellen induziert, wurde hier die Ratio von glattem endoplasmatischem Retikulum zu Zytoplasma im Zeitverlauf und zwischen gesunden und kranken Tieren verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Geräte und Software	Artikelnummer	Firma
ChemiDoc™ XRS+ System mit Image Lab™ Software	1708265	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Clear Flat-Bottom Immuno Nonsteril 96-well Plates	442404	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
CO ₂ -Inkubator	Modell C 150	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Elektronenmikroskop LEO 912AB		Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
iMark™ Microplate Absorbance Reader	1681130	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
iTEM 5.2	built 4768	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
Microplate Manager Software	1709520	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
SDR Sensor Dish Reader		PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
SigmaPlot Version 12.5		Systat Software Inc., San Jose, USA
Ultraturrax Dispergierer T-10		Ika Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Materialien		
Corticosterone rat/mouse ELISA	DEV9922	Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Deutschland
DuoSet ELISA Development System, rat CXCL2/CINC-3	DY525	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
OxoDish 24-well Platten	200000430	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Proteome Profiler™ Array, Rat Cytokine Array Panel A	ARY008	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Rat CXCL-1/CINC-1 Quantikine ELISA Kit	RCN100	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
S-Monovette®	02.1066.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Chemikalien		
1-Step™ Ultra-TMB-ELISA Solution	# 34029	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Amphotericin B		Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München, Deutschland
Antisedan®	1427685	Orion Corporation, Espoo, Finnland
Aprotinin	Sigma 0820-5MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumine	A8806-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bovine Type II Collagen	804001-sol	MD Bioproducts, St Paul, Minnesota, USA
Ciprofloxacin	Ciprobay 200	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
DMEM	Sigma D6434-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Domitor®	1344897	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	D1408-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	F0804-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fentanyl®	Ch.-B.: 4005A, Zul.-Nr.: 6762282.01.00	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Flumazenil	ES9763	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Freund's Adjuvant Incomplete liquid	Sigma F5506-10ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glutamin	G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HBSS	Sigma H8264-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
IL-1β	#400-01B	PeproTech Germany, Oberaltenallee 8, 22081 Hamburg, Deutschland
Isofluran Baxter	HGD9623	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Midazolam Ratiopharm	H43840	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
NaCl	3570310	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Narcanti®		Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	P0781-100ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Schwefelsäure 95-97%	MC1007312511	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Synacthen		Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
Tween® 20	P1379-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tiere		
DA-Ratten		Janvier Labs, Rodent research models & associated services, Saint-Berthvain Cedex, Frankreich

Tabelle 1: Materialliste

2.2 Arthritisinduktion

Alle folgenden Tierversuche wurden zusammen mit Prof. Dr. R. H. Straub, Dr. rer. nat. Christine Wolff und Dr. rer. nat. Hubert Stangl durchgeführt. Die weiblichen DA (Dark-agouti)-Ratten waren bei Ankunft ca. 9 Wochen alt und ca. 150 Gramm schwer (Janvier Labs, Rodent research models & associated services, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich), worauf sie 14 Tage an die neuen Haltungsbedingungen adaptiert wurden, bevor die Arthritis induziert wurde. Die Tiere wurden in offener Haltung bei einer Raumtemperatur von 21 Grad Celsius bei 55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Zuluft wurde über einen Schwebstofffilter gereinigt, die Luft wurde 16x/h ausgetauscht. Bei Arbeiten am Tier wurde Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe, Fußschutz) getragen. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn und nach Beendigung des Versuchs mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Käfige wurden mindestens einmal pro Woche neu eingestreut und hochdruckdesinfiziert. Die Haltungsbedingungen und Versuche wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (AZ 55.2-2532-2-413 und AZ 54-2532.1-25/13). Am Tag 0 eines jeden Versuchs wurden jeweils acht Ratten immunisiert. Acht weitere Ratten dienten als Kontrolltiere ohne Immunisierung. Insgesamt gab es auf diese Weise sechs Versuchstage. Die Versuche wurden einmal wiederholt (Tabelle 2).

	Tag 1a	Tag 1b	Tag 5a	Tag 5b	Tag 14a	Tag 14b	Tag 28a	Tag 28b	Tag 40a	Tag 40b	Tag 55a	Tag 55b	
Kontroll- tiere	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
CIA- Tiere	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
total	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	192

Tabelle 2: Schema über Tierzahlen und Entnahmezeitpunkte während der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA)

Zur Immunisierung wurden die Tiere zunächst mit einem Isofluran/Luftgemisch im Sinne einer volatilen Kurznaarkose für einige Sekunden betäubt (Isofluran Baxter, HGD9623, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Während dieser Zeit wurden Analgetika und weitere Narkotika i.m. appliziert. Die Dosierung für eine 150g schwere Ratte betrug dabei 22,5µg für Medetomidin ($\alpha 2$ Agonist: Sedativum/Analgetikum, Domitor®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), 0,3mg für Midazolam (Benzodiazepin: Hypnotikum/Sedativum, Dormicum®,

Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und 0,75µg für Fentanyl® (Opioidanalgetikum: stark analgetisch/hypnotisch, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Die Tiere standen nach ca. 10min für einen ca. 30minütigen Eingriff bereit. Im Anschluss erfolgte die Immunisierung. Eine Mischung aus gleichen Teilen einer essigsäuren Lösung von bovinem Kollagen Typ II (2mg/ml, MD Bioproducts, St Paul, Minnesota, USA) und inkomplettem Freund Adjuvant (F5506-10ML, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurde durch eine intensive Verfeinerung mittels Ultraschall und Ultraturrax (Ultraturrax Dispergierer T-10, Ika Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) hergestellt. Hiervon wurden pro Tier 300µl intradermal in die Schwanzbasis injiziert. Zusätzlich wurde jedes Tier während der Narkose mit einer individualisierenden Ohrmarke versehen und gewogen. Die Kontrolltiere wurden in der Wirkungszeit der volatilen Narkose individualisiert und gewogen. Den Tieren wurde im Anschluss eine Aufwachlösung aus Atipamezol (Antisedan®, Orion Corporation, Espoo, Finnland), Flumazenil (Anexate®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und Naloxon (Narcanti®, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) s.c. injiziert. Die Dosierung für eine 150g schwere Ratte betrug dabei 0,11mg für Atipamezol (α 2-Antagonist), 30µg für Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) und 18µg für Naloxon (Opioidantagonist). Die Tiere wurden während der Aufwachphase beobachtet.

2.3 Dokumentation des Krankheitsverlaufs

Der Eintritt und die Progression der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurde mittels Gewichtsverlauf und Scoringtabellen festgehalten. Ab Tag 5 wurden die Tiere täglich gewogen und der klinische Arthritiscore festgestellt. Pro Pfote wurden drei Regionen bewertet: Zehen, Mittelfuß und Tarsalgelenke (Hinterpfote) bzw. Karpalgelenke (Vorderpfote). Für eine entzündliche Schwellung wurde je Region maximal ein Punkt vergeben. Ein zusätzlicher Punkt pro Pfote wurde für Fehlstellung, Hinken, Gehbehinderung oder Schonhaltung vergeben. Pro Pfote konnten somit maximal 4 Punkte und pro Tier im Vollbild der Arthritis maximal 16 Punkte erreicht werden (Tabelle 3). Nach Abflauen der floriden Entzündung beim Übergang zur Chronizität wurden einmal erreichte Scores nicht mehr reduziert.

	rechts hinten	links hinten	rechts vorne	links vorne	
Zehen	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	
Mittelfuß	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	
Sprunggelenk (Tarsal-/Karpalgelenke)	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	
Fehlstellung	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	0 oder 1	
GESAMT					

Tabelle 3: Scoringschema

2.4 Tötung der Tiere, Organ- und Blutentnahme

Die Tiere wurden zum jeweiligen Entnahmetag mittels CO₂-Asphyxie getötet. Dabei wurden die Tiere alternierend aus Versuchs- und Kontrollgruppe (KO Ratten) und immer zur gleichen Tageszeit entnommen, um einen Einfluss zirkadianer Schwankungen möglichst gering zu halten. Auch am Tötungstag wurde das Körpergewicht aufgezeichnet und der Arthritisgrad festgestellt. Nach medianer Laparo- und Thorakotomie wurde zuerst Herzblut aus dem linken Ventrikel in EDTA-Monovetten (S-Monovette®, 9ml K3E, 1,6mg EDTA/ml Blut, Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) mit 15µl Aprotinin (5mg, 3350U/mg, Sigma-Aldrich) abgezogen. Das lyophilisierte Aprotinin wurde zuvor in 1,75 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert (0,9% Ecolav, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Aprotinin ist ein Trypsin-Inhibitor aus Rinderlunge, welcher Enzyme kompetitiv und reversibel blockiert und so der möglichen Degradation von Corticosteron im Blut entgegenwirken soll. Im Anschluss wurden die beiden retroperitoneal liegenden Nebennieren explantiert, das umliegende überschüssige Gewebe bis zur Organkapsel entfernt, gewogen und in sterilem Transportmedium bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt. 500mL Transportmedium bestand aus 443mL HBSS (Hank's balanced salt solution, H8264-500ML, Sigma-Aldrich), 5ml 1%iges Penicillin/Streptomycin (P0781-100ML, Sigma-Aldrich), 50ml hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS) (fetal bovine serum, F0804-500ML, Sigma-Aldrich), und 2ml Ciprofloxacin (2mg/ml, Ciprobay 200, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Das linksventrikuläre Blut wurde bei +4° Celsius für zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und das entnommene Plasma im Anschluss bei -20° Celsius bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.5 O₂-Messung

2.5.1 Prinzip der O₂-Messung

Mit dem SDR Sensor Dish® Reader der Firma PreSens (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) bestand die Möglichkeit, die Sauerstoffkonzentration in Gefäßen (Inkubationskammerchen) von Zellkulturplatten mit Zellkulturmedium nicht-invasiv zu messen. Subtrahierte man die durch den Stoffwechsel des Gewebes reduzierte Sauerstoffkonzentration von einem Inkubationskammerchen, das nur Medium ohne Gewebe enthielt (0-Wert, blank), so erhielt man den Nettosauerstoffverbrauch des inkubierten Gewebes. Der Sensor am Boden der durchsichtigen Zellkulturplatten bestand aus fluoreszierender Farbe. Von unterhalb sendete der SDR Sensor Dish® Reader einen Lichtstrahl aus, der den Farbstoff selbst wiederum zum Leuchten anregte (Abbildung 6). Anhand der Stärke des emittierten Fluoreszenzlichts mit bekannter Wellenlänge und eines entsprechenden Detektors wurde die entsprechende Sauerstoffkonzentration berechnet. Die Ermittlung der Sauerstoffkonzentration im Medium beruhte auf dem Prinzip der Fluoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff. Bei diesem sog. Lumineszenz-Quenching verhinderte ein Zusammentreffen von Sauerstoff mit dem Lumineszenzfarbstoff die Emission von Fluoreszenzlicht mit bekannter Wellenlänge, und der Sensor erfasste folglich eine insgesamt geringere Lichtintensität (Abbildung 6).

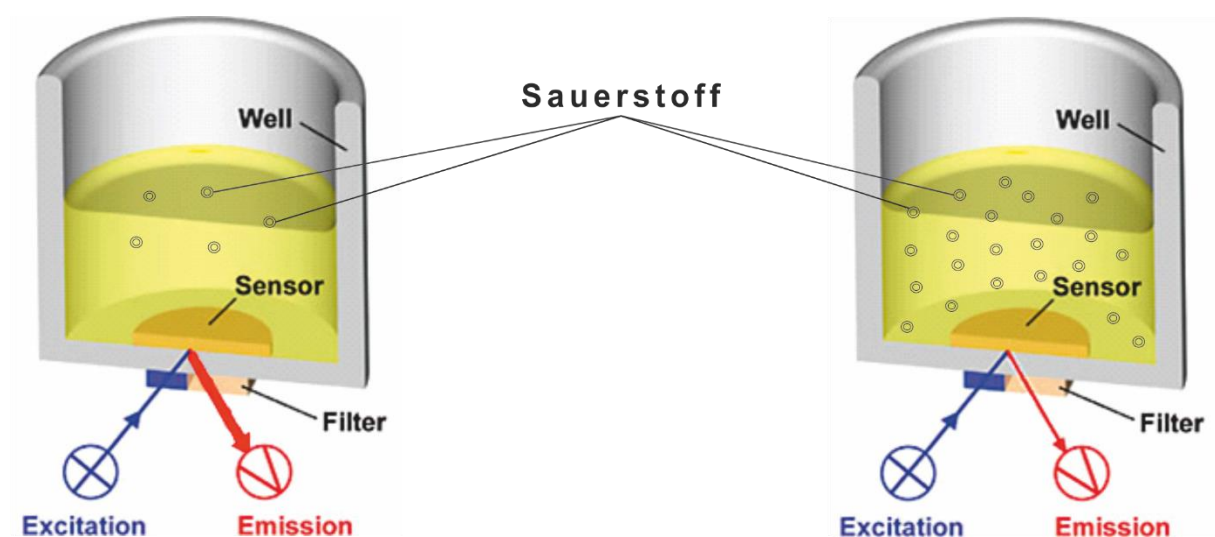


Abbildung 6: Funktionsweise der Sauerstoffmessung. Abbildung modifiziert nach Presens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland (118)

2.5.2 Vorgehensweise bei der O₂-Messung

Die Nebennieren wurden aus dem gekühlten Transportmedium unter sterilen Kautelen entnommen und einmal mit Stimulationsmedium gewaschen. 500mL des Stimulationsmediums bestanden aus 488mL DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, D6434-500ML, Sigma-Aldrich), 5ml 1%iges Glutamin (L-Glutamin, G7513, 200mM, Sigma-Aldrich), 5ml 1%iges Penicillin/Streptomycin (P0781-100ML, Sigma-Aldrich), 500µl Amphotericin B (50mg, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München, Deutschland), 2ml Ciprofloxacin (2mg/ml, Ciprobay 200, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und 0,2% BSA (bovines Serumalbumin) (A8806-5G, Sigma-Aldrich). Die Nebennieren wurden mit einem sterilen Skalpell geachtelt und alle Achtel wurden in jeweils ein mit Stimulationsmedium befüllten Inkubationskammerchen der OxoDish-Platten (OxoDish 24-well, Art.-Nr.: 200000430, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) nach einem definierten Schema (Abbildung 7) zugegeben. Bei der Hälfte der Inkubationskammerchen wurde nun IL-1 β in einer Endkonzentration von 1ng/ml (recombinant rat IL-1 β , PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland) zugegeben, wobei das finale Volumen bei allen Inkubationskammerchen 1mL betrug. Daraufhin wurden die lichtsensitiven Platten 12h über Nacht in einem Brutschrank (CO₂-Inkubator, Modell C150, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei 37° Celsius und 5% CO₂-Gehalt im Dunkeln vorinkubiert.

		Kontroll-Ratten		immunisierte Ratten		
Platte 1:	1	2	3	4	5	6
A	Medium Kontrolle	ACTH	ACTH	ACTH	ACTH	Medium Kontrolle
B	Medium Kontrolle	-	-	-	-	Medium Kontrolle
C	Medium Kontrolle	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	Medium Kontrolle
D	Medium Kontrolle	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β	Medium Kontrolle

		Kontroll- Ratten		immunisierte Ratten		
Platte 2:	1	2	3	4	5	6
A	Medium Kontrolle	ACTH	ACTH	ACTH	ACTH	Medium Kontrolle
B	Medium Kontrolle	-	-	-	-	Medium Kontrolle
C	Medium Kontrolle	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	IL-1 β + ACTH	Medium Kontrolle
D	Medium Kontrolle	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β	Medium Kontrolle

Abbildung 7: Belegungsplan der OxoDish 24-well Platten.

Am nächsten Morgen wurden diese Platten in den Brutschrank (CO₂-Inkubator, Modell C150, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) mit dem Sauerstoffmessgerät überführt, der ebenfalls auf 37° Celsius und 5% CO₂-Gehalt eingestellt wurde. Sofort wurde die Messung für eine Dauer von 3,5h begonnen, um bei Erreichen der Temperaturkonstanz in diesem System die basalen Verbrauchswerte der individuellen Nebennieren bestimmen und so einen Bezugspunkt vor ACTH-Stimulation erhalten zu können. Nach 3,5h wurden die Platten für kurze Zeit entnommen und unter einer Laminar Air flow-Bank steril nach obigem Schema mit 10⁻⁷ mol/l ACTH-Analogon (Synacthen, 0,25mg/ml, Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz) stimuliert. Die Stammlösung mit 10⁻⁵ mol/l wurde dann durch Zugabe von 9 μ l auf 900 μ l im Inkubationskammerchen 1:100 verdünnt. Kurz zuvor wurden noch pro Inkubationskammerchen 3x33 μ l Überstand entnommen, um für spätere Auswertungen einen Bezugspunkt vor ACTH-Stimulation zu erhalten (Abbildung 8). Diese Proben wurden bei -20° Celsius eingefroren. Die Platten wurden wieder in den Brutschrank des Sauerstoffmessgerätes gestellt, und die Messung wurde für weitere 6h fortgesetzt. Die O₂-Konzentration wurde in jedem Inkubationskammerchen alle 3 Minuten automatisch bestimmt. Am Ende der Sauerstoffmessung wurden 2x100 μ l und 1x300 μ l Überstand entnommen und ebenfalls bei -20° Celsius eingefroren. Bei der Auswertung

wurden zwei Zeitabschnitte der Sauerstoffmessung in Relation gestellt. Als Basiswert (100%) wurde der Mittelwert aus 20 Messwerten von Stunde 2,5-3,5 gewählt. Kurz darauf erfolgte die ACTH-Stimulation. Mit dem Basalwert wurde dann der Mittelwert aus ebenfalls 20 Messwerten von Stunde 8,5-9,5 nach ACTH Stimulation in Beziehung gesetzt.

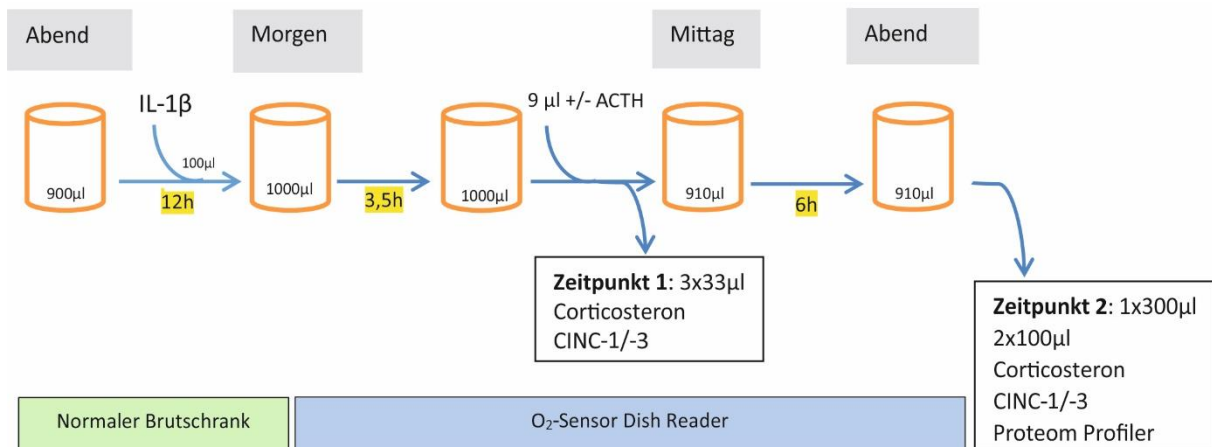


Abbildung 8: Stimulationsschema der Nebennieren während der Sauerstoffmessung

2.6 Corticosteronmessung

2.6.1 Prinzip des Enzyme-linked-Immunosorbent Assay

Ein ELISA ist eine immunologische Methode, um quantitativ bestimmte Proteine aus dem Probenmaterial zu detektieren. In den folgenden Untersuchungen wurde ein kompetitiver Immunassay gewählt. Die Detektion erforderte spezifische Antikörper (polyklonale Anti-Corticosteron-Antikörper des Hasen) gegen ein bestimmtes Epitop des zu untersuchenden Moleküls. Eine aufsteigende Standardreihe und eine Nullkontrolle dienten als Kalibrierung. Durch Zugabe eines Inkubationspuffers in die Reaktionskammern wurden optimale pH- und Elektrolytwerte geschaffen. Ein Enzymkonjugat, welches aus einem an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Corticosteron-Analogon bestand, wurde zugegeben. HRP ist ein Enzym, welches den Farbumschlag und somit die Detektion am Ende des Assays katalysierte. Je mehr des zu messenden Moleküls in der Probe (hier Corticosteron) vorhanden war, desto weniger HRP-gekoppeltes Corticosteron-Analogon konnte an die Detektions-Antikörper binden und eine Farbreaktion hervorbringen. Es folgte eine zweistündige

Inkubation, mehrere Waschschritte und die Zugabe der Substratlösung. Diese enthielt Tetramethylbenzidin und H_2O_2 . HRP katalysierte nun unter Zuhilfenahme von H_2O_2 eine Reaktion, woraus aus Tetramethylbenzidin ein blauer Farbstoff entstand. Nach einer weiteren Inkubation für eine halbe Stunde und Zugabe einer Stopplösung (2N Salzsäure), die den Farbstoff protonierte, erfolgte ein Farbumschlag in Richtung Gelb. Durch das kompetitive Prinzip des Assays entstand nun eine indirekte oder auch reziproke Proportionalität zwischen dem in der Probe enthaltenen Corticosteron und der optischen Dichte, welche bei 450nm gemessen wurde. Je weniger Corticosteron in der Probe enthalten war, desto mehr HRP-Corticosteron-Analogon konnte an die Antikörper binden und desto höher war die optische Dichte.

2.6.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf

2.6.2.1 Plasmacorticosteronbestimmung

Für die Untersuchung der Plasmaproben wurde der Corticosterone rat/mouse ELISA, (REF: DEV9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Deutschland) herangezogen. Je 10µl der Proben wurden unverdünnt in ein Inkubationskammerchen der ELISA-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von je 10µl der Standardreihe und PBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline, D1408-500ML, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) als Nullkontrolle wurden pro Inkubationskammerchen 100µl Inkubationspuffer und 50µl Enzymkonjugat hinzugefügt. Danach wurde die Probe über 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Mikroplattenrüttler bei 600rpm inkubiert. Die Platten wurden im Anschluss viermal mit einem Waschpuffer gewaschen, bevor 200µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin mit H_2O_2) hinzugegeben wurden. Im Dunkeln wurden die Proben daraufhin für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen und die optische Dichte wurde sofort im Anschluss bei 450nm gemessen. Hierzu diente als Messgerät der iMark™ Microplate Absorbance Reader (Best.-Nr.: 1681130, Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA). Für die Auswertung wurde die Microplate Manager Software (Best.-Nr.: 1709520, Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA) verwendet.

2.6.2.2 Corticosteronbestimmung aus Überständen

Für die Corticosteronbestimmung aus den Überständen vor und nach ACTH-Stimulation wurde nach gleicher Art und Weise wie unter Punkt 2.6.2.1

Plasmacorticosteronbestimmungsvorgegangen. Hier wurden die Überstände auf Grund zu erwartender höherer Corticosteronkonzentrationen vorverdünnt.

2.7 CINC-1- & CINC-3-Messung

2.7.1 Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Für die Bestimmung der Proteine CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1, CXCL-1) und CINC-3 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3, CXCL-2) wurden zwei ELISA in Sandwich-Methode nach Angaben des Herstellers verwendet (Rat CXCL-1/CINC-1 Quantikine ELISA Kit, Rat CXCL2/CINC-3 DuoSet ELISA Development System, R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). Primärantikörper der Maus waren gegen CINC-1 bzw. CINC-3 der Ratte gerichtet. Der biotinylierte Detektionsantikörper stammte aus der Ziege. Es folgten Inkubations- und Waschschrte, um eine spezifische Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe zu erreichen. Anschließend wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin zugegeben. Streptavidin geht eine quantitative Bindung mit dem Biotin der Detektionsantikörper ein. Daraufhin wurde das Substrat der HRP, das Tetramethylbenzidin, zugegeben. Nach Abstoppen dieser Reaktion durch 2N Schwefelsäure wurde im Anschluss die optische Dichte der Probe gemessen. Je mehr CINC-1 / CINC-3 in der Probe enthalten war, desto höher war die optische Dichte.

2.7.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf

Der Primärantikörper wurde zunächst in 1 ml PBS (Sigma) gelöst. Nach Verdünnung in PBS auf eine Konzentration von 2,0 µg/ml wurden die Microtiterplatten (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-well Plates, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) mit dem Primärantikörper beschichtet. Nach einer ersten Inkubation über Nacht erfolgten Waschschriffe mit 0,05% Tween (P1379-500ML, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in PBS (Waschpuffer). Geblockt wurden die Platten mit *Reagent Diluent*, einer Lösung aus 1% BSA (Sigma) in PBS. Nun wurden in ein Inkubationskammerchen je 100µl der verdünnten Proben pipettiert. Die Proben wurden zwischen 1:6 und 1:10 verdünnt. Bei der anschließenden Berechnung der Daten wurde der jeweilige Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Die Standardreihe und der Nullwert wurden in die Inkubationskammerchen gegeben, und anschließend wurde für 2 Stunden inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriffe erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers. Dieser biotinylierte Antikörper wurde auf eine Konzentration von 50ng/ml in *Reagent Diluent* verdünnt. Davon wurden 100µl in jedes Inkubationskammerchen pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Es erfolgte vor Zugabe der HRP ein weiterer Waschschriffe. HRP war an Streptavidin gekoppelt und konnte so an das Biotin des Detektionsantikörpers binden. Es folgte ein Waschschriffe und im Anschluss wurden 100µl Ultra-TMB (1-Step™ Ultra-TMB-ELISA Solution, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) mit H₂O₂ für weitere 15 Minuten zugegeben. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 50µl 2N Schwefelsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde die optische Dichte bei 570nm Wellenlänge gemessen. Für diese Auswertung wurde das gleiche Messgerät wie bei den Corticosteron-ELISAs herangezogen.

2.8 Proteom Profiler

2.8.1 Prinzip des Proteom Profilers

Proteom Profiler verwendet man um gleichzeitig viele verschiedene Zytokine in einer Probe erfassen zu können. Dieser Array wurde vor Durchführung der o.g. CINC-ELISAs angewendet, um eine generelle Vorstellung davon zu bekommen, welche Zytokine von den Nebennieren während der Inkubationszeit mit IL-1 β und ACTH gebildet wurden. Es konnte der relative Anteil an Zytokinen mit diesem Sandwich-Immunoassay semiquantitativ bestimmt werden. Zugrunde lagen Nitrocellulosemembranen, auf denen Primärantikörper in einer definierten Matrix aufgebracht waren, was die genaue Zuordnung der Signale zu den verschiedenen Zytokinen ermöglichte. Im Folgenden wurden die Detektionsantikörper mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Diese Antikörper waren biotinyliert, um später an mit Streptavidin gekoppelte Merrettichperoxidase (HRP) binden zu können. Das Gemisch aus Probe und Detektionsantikörper wurde auf die Membran aufgebracht. Hier erfolgte die Bindung des membranhaftenden Primärantikörpers an ein Epitop des Zytokins aus der Probe, welches bereits den Detektionsantikörper an einem anderen Epitop gebunden hatte. Unspezifische Bindungen wurden durch Waschschrte vermindert. Nach Zugabe von Streptavidin-HRP, H₂O₂ und Luminol wurde unter Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge eine direkte Proportionalität zu den in der Probe enthaltenen Zytokinen hergestellt. Durch diese Chemilumineszenzreaktion konnte ein Verhältnis der Menge der verschiedenen Proteine auf derselben Membran hergestellt werden.

2.8.2 Verwendete Materialien, Proben und Versuchsablauf

Für die Zytokinbestimmung wurden die Überstände der Tage 40 und 55 nach vollendeter O₂-Messung vermengt, um im chronischen Bereich der Kollagen-induzierten Arthritis die Zytokine zu messen. Hierzu wurden acht Membranen verwendet, um alle vier Bedingungen zwischen Kontrolltieren und arthritischen Tieren zu erfassen (Tabelle 4).

Membran 1	Kontrolltiere, unstimuliert	Membran 5	Kontrolltiere, ACTH-stimuliert
Membran 2	CIA-Tiere, unstimuliert	Membran 6	CIA-Tiere, ACTH-stimuliert
Membran 3	Kontrolltiere, IL-1 β -stimuliert	Membran 7	Kontrolltiere, ACTH- & IL-1 β -stimuliert
Membran 4	CIA-Tiere, IL-1 β -stimuliert	Membran 8	CIA-Tiere, ACTH- & IL-1 β -stimuliert

Tabelle 4: Art der verschiedenen mittels Proteom Profiler gemessenen Überstände

Es wurde ein Gemisch mit insgesamt 1,6ml Probenmaterial pro Membran erstellt, welches sich aus 16 Nebennieren von 16 Tieren zusammensetzte (Tabelle 4). Für die Messung wurde der Proteome Profiler™ Array, Rat Cytokine Array Panel A (Katalognummer: ARY008, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet. Nach Zugabe eines Puffers wurden 15 μ l des gelösten Detektionsantikörpers zugegeben. Die Membranen wurden am Folgetag jeweils mit 2ml einer 1:2000 verdünnten Streptavidin-HRP Lösung für 30min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden im Anschluss lichtgeschützt eine Minute mit H₂O₂ und Luminol inkubiert, um die Lumineszenzreaktion zu ermöglichen. Die weitere Auswertung erfolgte mittels ChemiDoc™ XRS+ System mit Image Lab™ Software (Best.-Nr.: 1708265, Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA). Mit der Image Lab™ Software wurden die Dots nach der mittleren Pixeldichte abzüglich des Hintergrunds (Negativkontrolle) ausgewertet. Je höher die Pixeldichte, desto mehr Zytokine dieses Dots waren in der Ursprungsprobe enthalten.

2.9 Elektronenmikroskopische Auswertung der Fläche des glatten endoplasmatischen Retikulums in Bezug auf die Fläche des Zytoplasmas der Nebenniere

Die Fläche des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) der *Zona fasciculata*-Zellen von CIA-Ratten und Kontrolltieren sollte in Relation zum Zytoplasma dargestellt werden. Die Schnitte der Nebennieren entstammten nicht den o.g. Tieren, sondern aus einer Untersuchung an Ratten, die sich mit der elektronenmikroskopischen Auswertung von Mitochondrien und Lipidvakoulen bei CIA beschäftigt hatte (113). Mikroskopiert wurde im Parenchym der *Zona fasciculata*. Voraussetzung bei der durch Mitarbeiter des pathologischen Instituts durchgeführten Bedienung des Elektronenmikroskops war, möglichst nicht in Bereichen mit Blutgefäßen (extrazellulär) oder Zellkernen zu mikroskopieren. Die Bilder entsprachen einer 20.000fachen Vergrößerung und einer Auflösung von 2.048x2.048 Pixeln. Vor der Auswertung wurden die Bilder doppelt gespeichert, um die Fläche des sER und des Zytoplasmas in separaten Bilddateien analysieren zu können. Für die Auswertung wurde das Programm iTEM (iTEM 5.2, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) verwendet. Die jeweiligen Flächen der Organellen wurden manuell mittels Polygonen definiert. Da die verschiedenen monomembranösen Organellen einer Nebennierenzelle in der Transelektronenmikroskopie nicht voneinander zu unterscheiden waren, wurden für die Definition des Zytoplasmariums und des sERs folgende Bedingungen für die Auswertung festgelegt: Der Zytoplasmarium wurde als Grundfläche des Bildes ($4.609\text{nm} \times 4.609\text{nm} = 21.242.881\text{ nm}^2$) abzüglich Lipidtröpfchen, Mitochondrien und Cholesterinkristallen definiert (Abbildung 9). Unter den Begriff „sER“ flossen alle monomembranös umfassten intrazellulären Vesikelstrukturen ein. Somit wurden auch der Golgi-Apparat, Lysosomen, Peroxisomen, Endo- und Exozytosevesikel, und sich vom Hintergrund heller abhebende, ER-artige Strukturen mitefasst (Abbildung 10). Raues ER wurde erst ab einer Ribosomenanzahl >2 an der Membran gewertet und damit vom sER abgegrenzt. Auf diese Art und Weise wurden pro Versuchszeitpunkt je eine Nebenniere von 2 Kontroll- und 2 CIA-Tieren ausgewertet. Pro Untersuchungstag entstand bei 48 Bildern (4 Meshs à 12 Bilder) pro Tier eine Serie von 192 Bildern. Die Auswertung beinhaltete 4 Zeitpunkte während des Krankheitsverlaufs, nämlich die

Versuchstage 1, 5, 28 und 55 nach Arthritisinduktion (Tabelle 5). Ausgewertet wurde pro Bild jeweils die Ratio aus Fläche des sER / Zytoplasmafläche.

$$Ratio = \frac{sER}{Zytoplasma}$$

	Nebenniere Kontrolltier	Nebenniere Kontrolltier	Nebenniere CIA-Tier	Nebenniere CIA-Tier	Bilder pro Tag
Versuchstag 1	48	48	48	48	192
Versuchstag 5	48	48	48	48	192
Versuchstag 28	48	48	48	48	192
Versuchstag 55	48	48	48	48	192

Tabelle 5: Verteilung der elektronenmikroskopischen Bilder

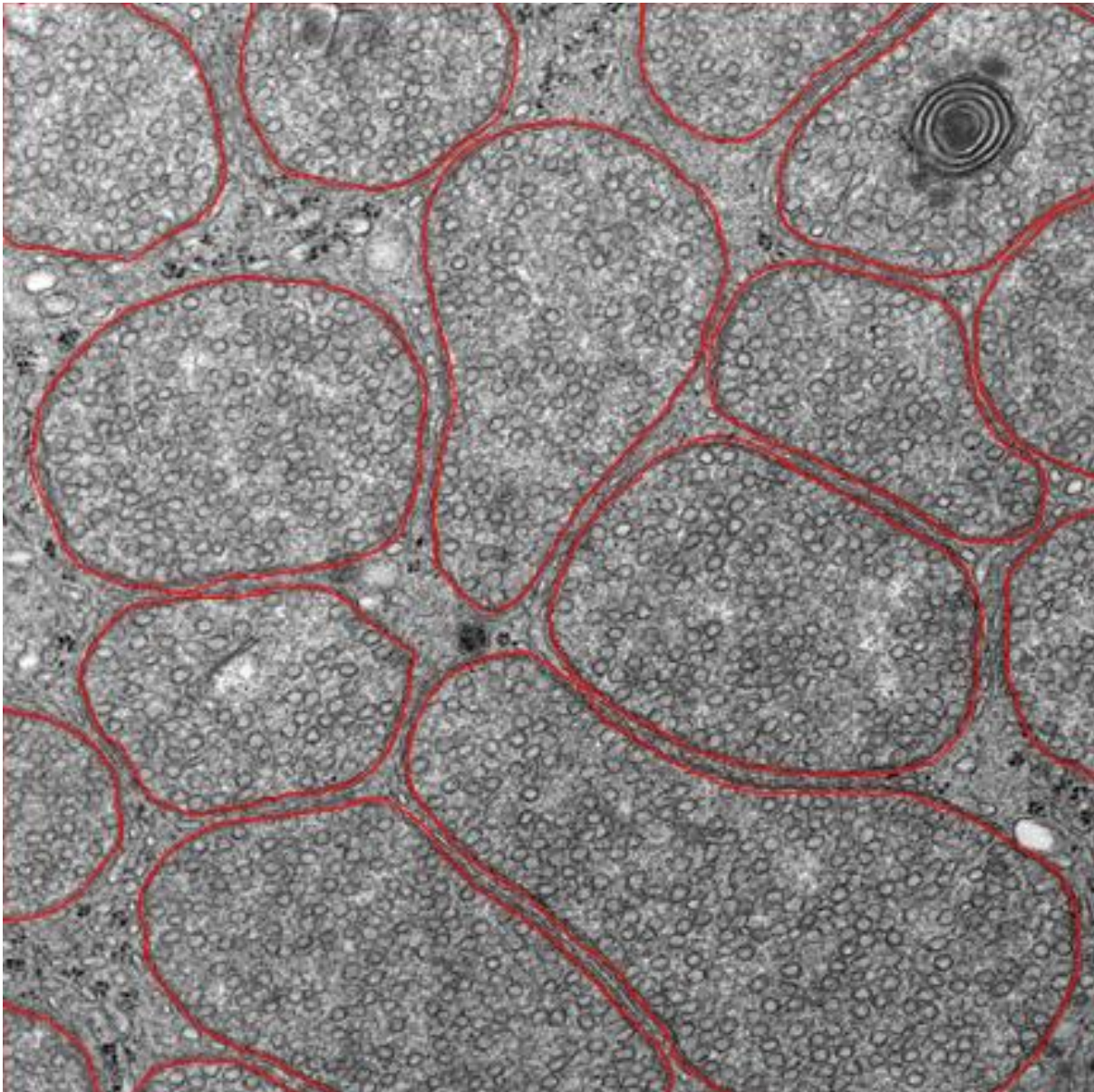


Abbildung 9: Ermittlung der Zytoplasmafläche. Elektronenmikroskopischer Ausschnitt der *Z. fasciculata* der Nebenniere einer immunisierten Ratte. 20000fache Vergrößerung, Mitochondrien rot umkreist

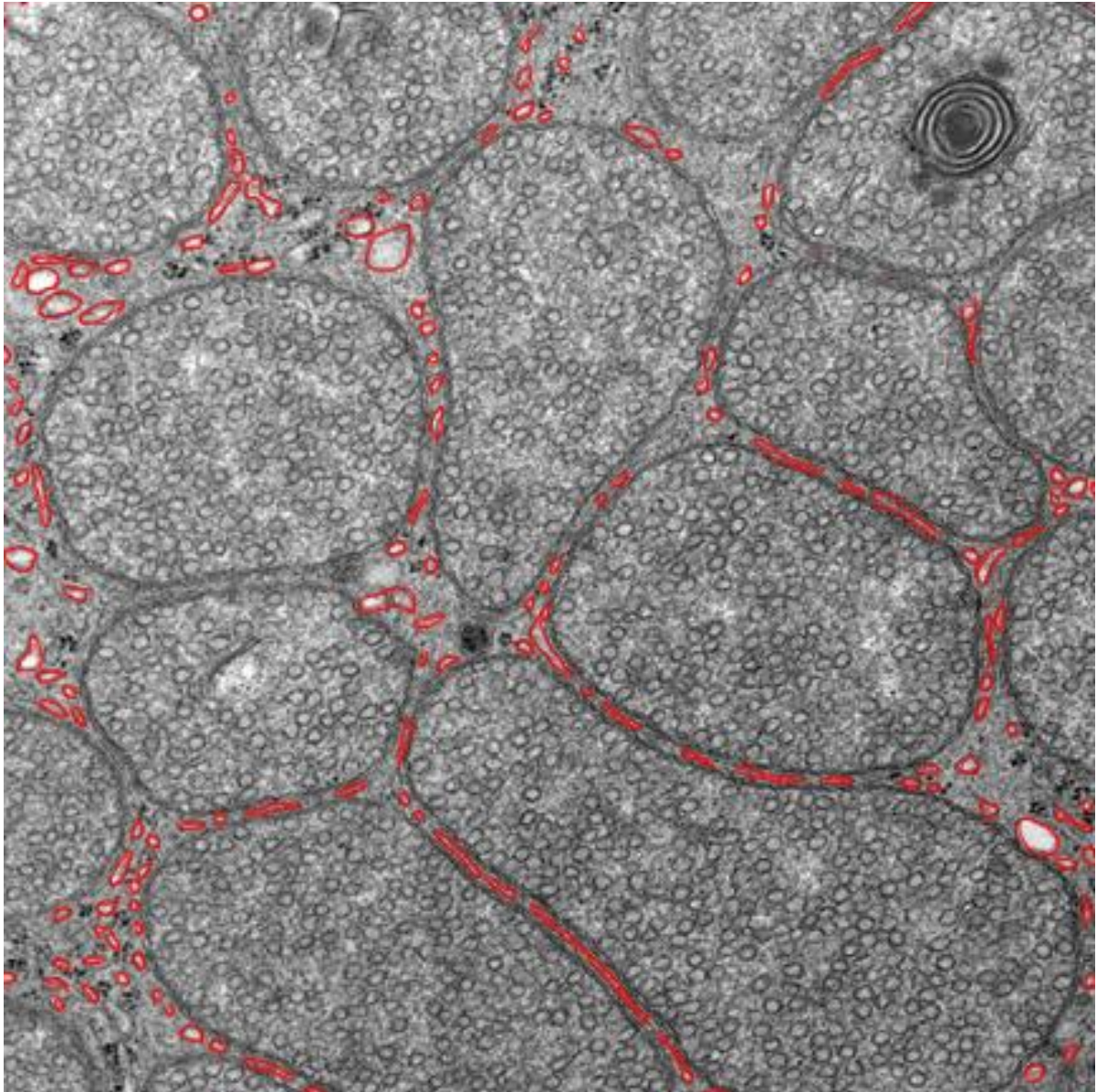


Abbildung 10: Ermittlung der sER-Fläche. Elektronenmikroskopischer Ausschnitt der *Z. fasciculata* der Nebenniere einer immunisierten Ratte. 20000fache Vergrößerung, „sER“-Fläche rot umkreist

2.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit SigmaPlot Version 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Sofern nicht anders angegeben, wurde für Gruppenvergleiche der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Aufgrund der explorativen Art dieser Untersuchungen erfolgte bei der statistischen Analyse keine Bonferroni-Korrektur für einen mehrfachen Vergleich.

Für einen mehrfachen Gruppenvergleich wurde das General Linear Model mit Holm-Sidak Methode angewendet.

Die Nebennieren- und Körpergewichte, die Corticosteron- und die CINC-Konzentrationen, der Sauerstoffverbrauch und die elektronenmikroskopische Flächenberechnungen der Nebennieren wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Diese Ergebnisse wurden als vertikale Box-Plots dargestellt, wobei eine Box dem Bereich entspricht, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Diese wird durch das obere und das untere Quartil (25stes und 75stes Perzentil) begrenzt. Der Median wurde in der Box als durchgehender horizontaler Strich dargestellt. Die Begrenzungen der *Whiskers* repräsentieren das 10te und 90ste Perzentil.

Vergleiche derselben Nebennieren nach bzw. vor erfolgter Stimulation wurden mit dem Wilcoxon Signed Rank Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurden bei allen Tests p-Werte $\leq 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Score und Gewicht im Verlauf der Arthritis

Die Klinik der Arthritis begann, gemessen am Arthritis-Score, in etwa an Tag 14 nach Immunisierung (Abbildung 11). Hier entwickelten die immunisierten Tiere Entzündungszeichen an den betroffenen Gelenken der Pfoten. Der Höhepunkt wurde etwa ab Tag 28 erreicht (Abbildung 11).

Betrachtete man den Verlauf der Körpergewichte, so zeigte sich, dass ab Tag 5 die Gewichts Differenz statistisch signifikant wurde und bis zum jeweiligen Versuchsende signifikant blieb (Abbildung 12). Die arthritischen Ratten verloren zunächst an Gewicht, während das Gewicht der Kontrolltiere kontinuierlich stieg (Abbildung 12). Ab Tag 25 zeigten auch die Körpergewichte der immunisierten Tiere wieder eine Zunahme, erreichten aber über den ganzen Zeitverlauf des Experiments nicht mehr das Niveau des Gewichts der Kontrolltiere (Abbildung 12).

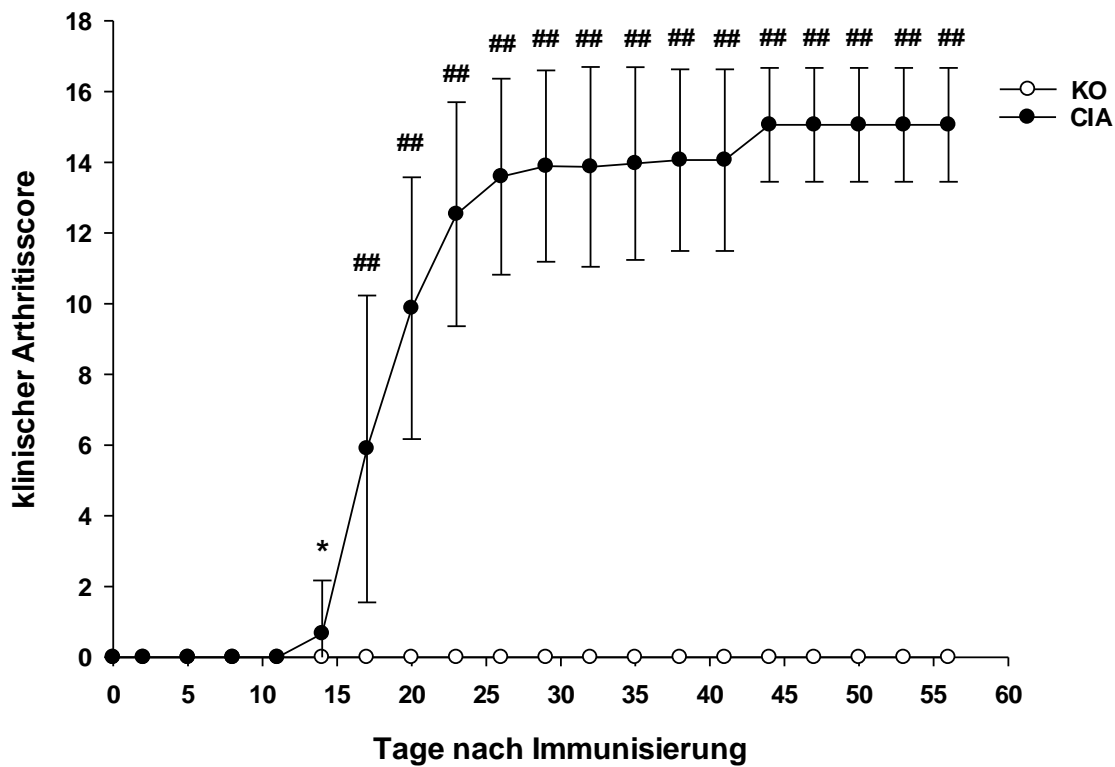


Abbildung 11: Verlauf klinischer Arthritiscore. General Linear Model – Holm-Sidak-Test. Ein Punkt steht für den Mittelwert der klinischen Arthritiscores der Tiere an einem bestimmten Tag nach Immunisierung. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ## = $p < 0,001$ im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

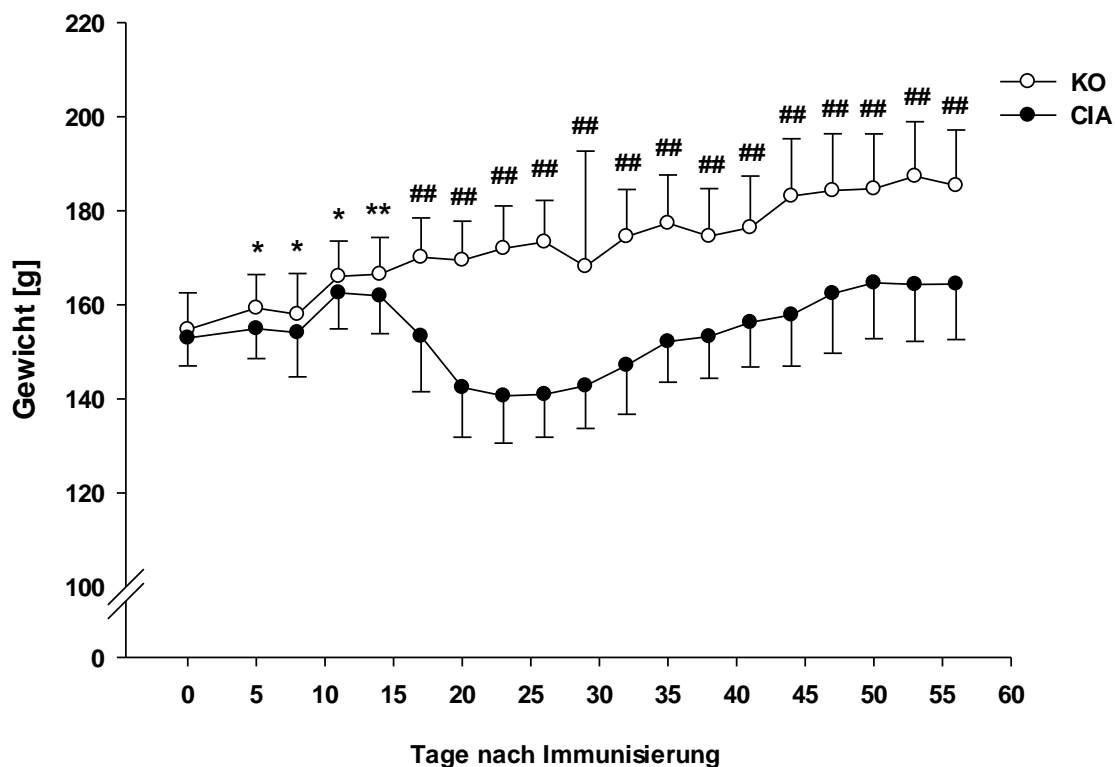


Abbildung 12: Gewichtsverlauf. General Linear Model – Holm-Sidak-Test. Ein Punkt steht für den Mittelwert der Körpergewichte der Tiere an einem bestimmten Tag nach Immunisierung. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ## = $p < 0,001$ im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.2 Absolutgewichte und Ratio Nebennierengewicht / Körpergewicht

Betrachtete man die Absolutwerte der direkt nach Entnahme gewogenen Nebennieren, so war an Tag 1 und an Tag 28 eine statistisch signifikante Differenz zwischen den arthritischen Tieren und Kontrolltieren festzustellen (Abbildung 13). Zu diesen beiden Zeitpunkten waren die Nebennieren der immunisierten Tiere schwerer als die der gesunden Tiere. An allen anderen Tagen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 13).

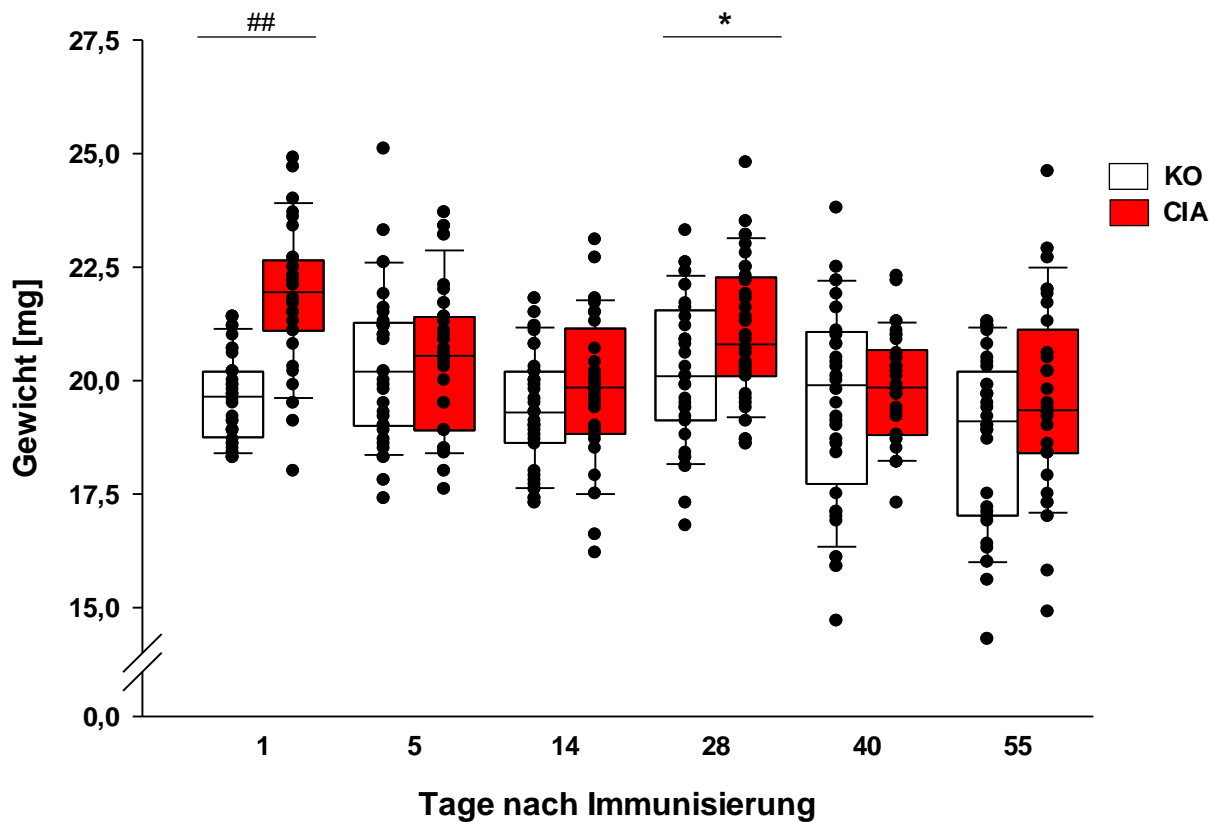


Abbildung 13: Absolutwerte der Nebennierengewichte in mg. Ein Punkt repräsentiert eine Nebenniere. Pro Box sind 16 Tiere mit insgesamt 32 Nebennieren enthalten. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ## = $p < 0,001$; jeweils im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich).. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Es zeigte sich, dass die Ratio Nebennierengewicht / Körpergewicht an allen untersuchten Tagen bei den CIA-Tieren höher war als bei den gesunden Kontrolltieren (Abbildung 14). An den Tagen 1, 28, 40 und 55 waren diese Unterschiede statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$). Betrachtete man ausschließlich die Kontrolltiere, lies sich eine Tendenz zur kontinuierlichen Abnahme der Ratio feststellen. Bei Betrachtung der CIA-Tiere ab Tag 28 zeigte sich nahezu eine Wiederholung der Werte der ersten drei Untersuchungstage (Abbildung 14).

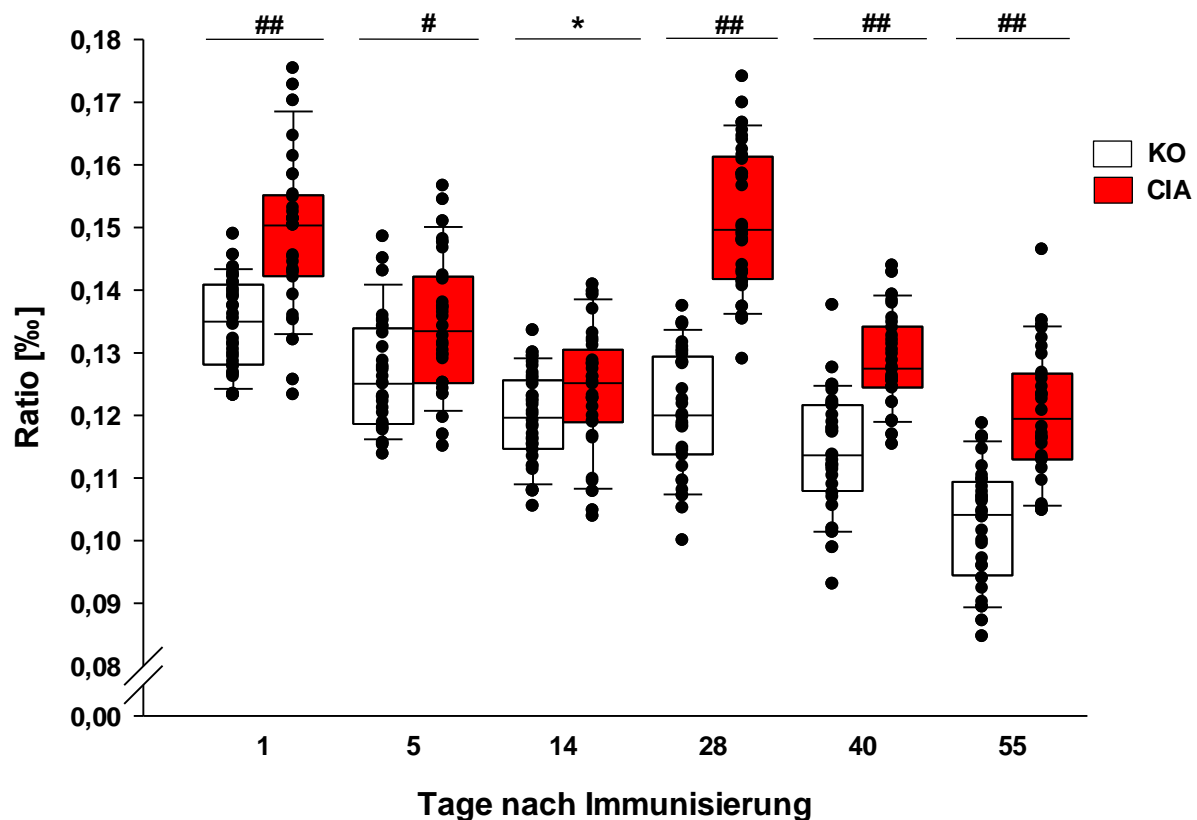


Abbildung 14: Ratio aus Nebennierengewicht in mg / Körpergewicht in mg. Ein Punkt repräsentiert eine Ratio aus Nebenniere/Körpergewicht eines Tieres. Pro Box sind 16 Tiere mit insgesamt 32 Nebennieren enthalten. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.3 Plasmacorticosteronkonzentration

Im kompletten Zeitverlauf zeigten sich zu keinem der untersuchten Tage signifikante Unterschiede zwischen den Plasmacorticosteronkonzentrationen der gesunden und der immunisierten Tiere in Relation zum Gewicht der Nebennieren (Abbildung 15). Die durchschnittlich höchsten Corticosteronwerte aus der Reihe der CIA-Tiere bestanden jedoch an Tag 14 während des klinischen Krankheitsausbruchs. Sie waren jedoch statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber anderen Versuchszeitpunkten. Im weiteren Verlauf nahmen die Durchschnittscorticosteronwerte der CIA-Tiere tendenziell wieder kontinuierlich ab. Einem ähnlichen Verlauf unterlagen die Corticosteronwerte der Kontrolltiere (Abbildung 15).

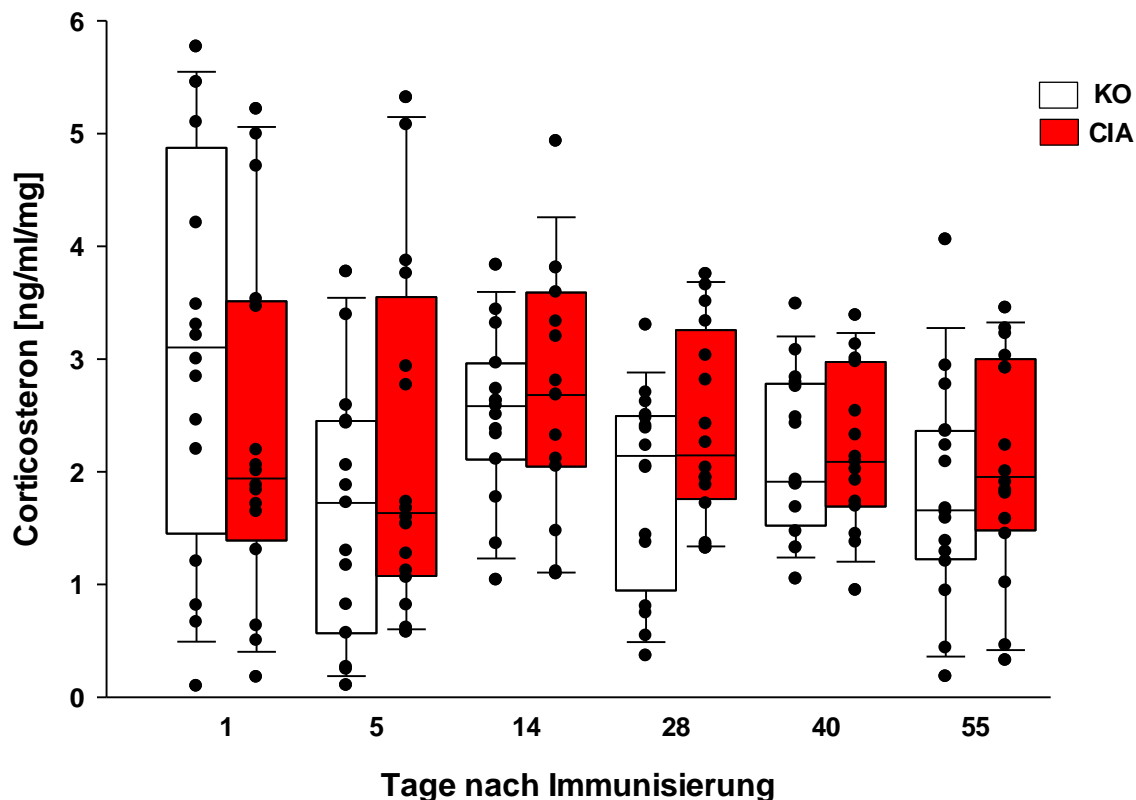


Abbildung 15: Plasmacorticosteronkonzentration in Relation zum Gewicht der Nebennieren. Ein Punkt repräsentiert die Plasmacorticosteronkonzentration eines Tieres pro mg Nebennierengewicht. Pro Box sind 16 Tierwerte enthalten. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.4 Bestimmung der Corticosteron-Sekretion während und nach der O₂-Messung am explantierten Organ

3.4.1 Corticosteron-Sekretion je Versuchstag

Die Nebennieren, die für die O₂-Messung verwendet wurden, unterlagen verschiedenen Stimulationsbedingungen (Abbildung 7).

Am fünften Tag nach Immunisierung zeigten die mit IL-1 β und die mit ACTH und IL-1 β inkubierten Nebennieren eine signifikant höhere Corticosteron-Sekretion als die unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 16).

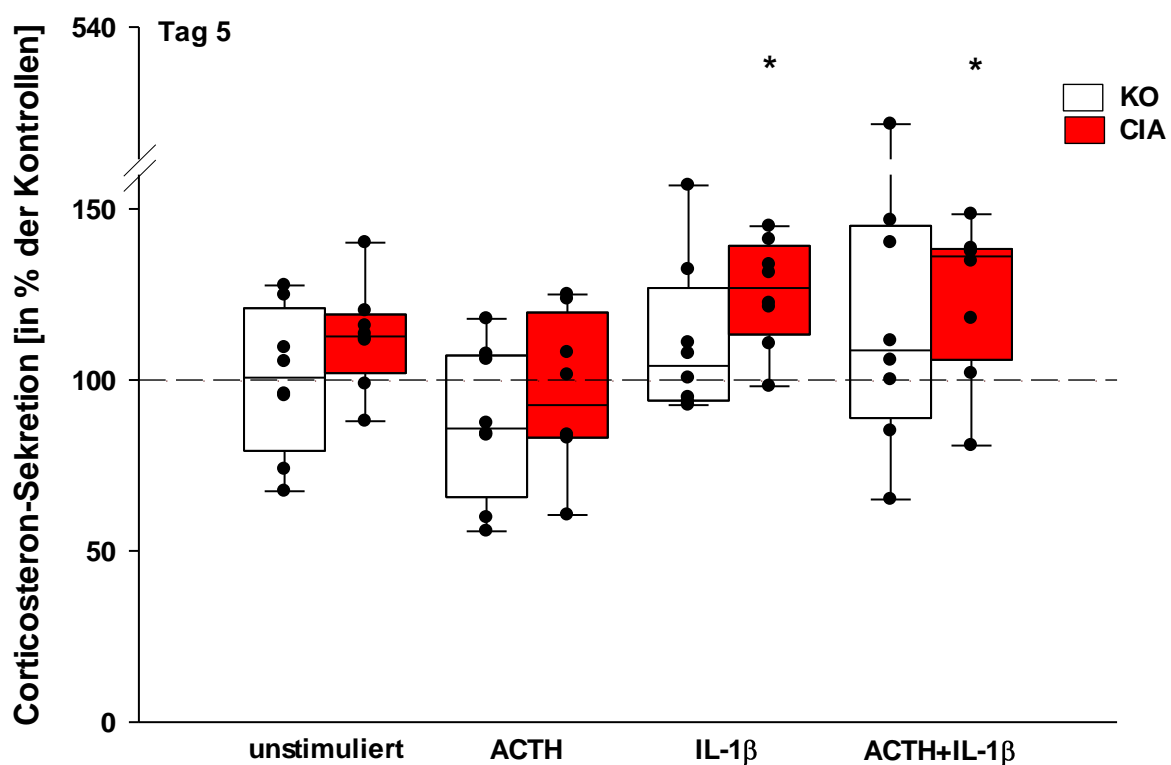


Abbildung 16: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p<0,05; im Vergleich zu der Corticosteron-Sekretion der unstimulierten Kontrolltiere (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am 28sten Tag nach Immunisierung der Tiere zeigten deren stimulierten Nebennieren gegenüber den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere keine signifikanten Änderungen der Corticosteron-Sekretion (Abbildung 17).

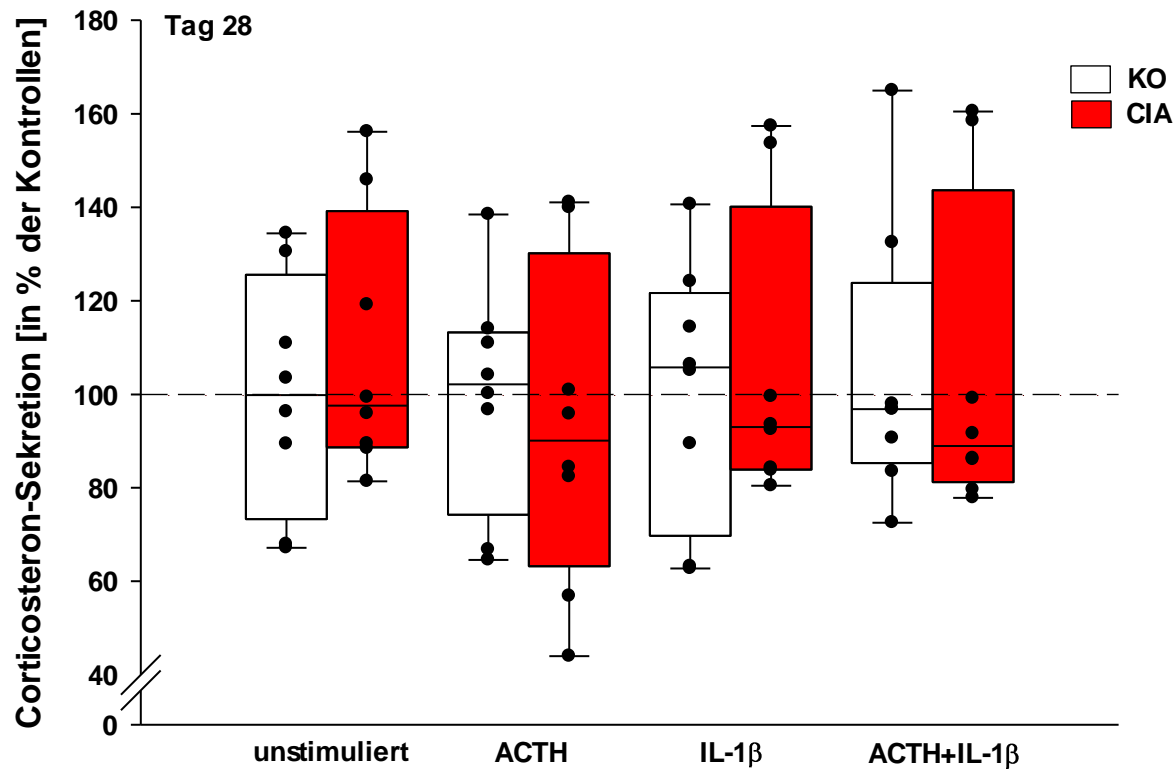


Abbildung 17: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am 55sten Tag nach Immunisierung der Tiere sezernierten die unstimulierten Nebennieren und alle stimulierten Nebennieren der CIA-Tiere signifikant weniger Corticosteron als die Nebennieren der unstimulierten Kontrolltiere. Im direkten Vergleich der Nebennieren der CIA-Tiere gegenüber den Nebennieren der Kontrolltiere unter ACTH- oder IL-1 β -Stimulation sezernierten erstere signifikant weniger Corticosteron (Abbildung 18).

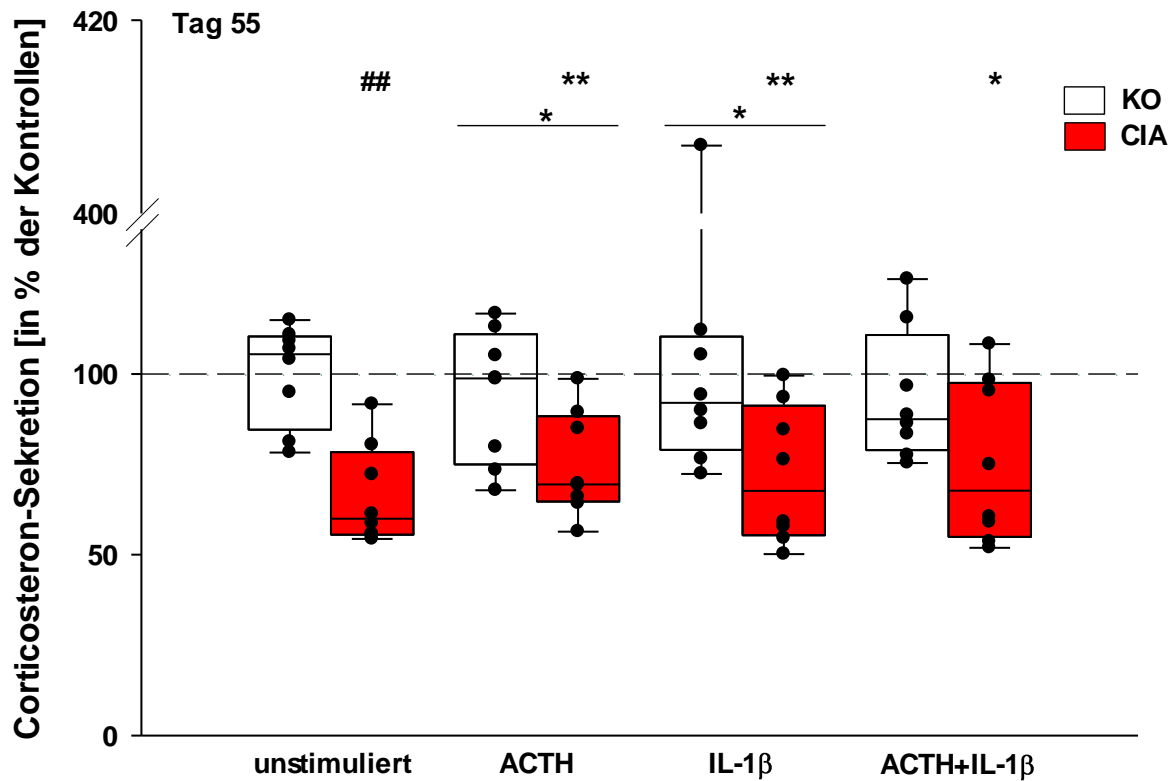


Abbildung 18: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ## = $p < 0,001$; im Vergleich zu der Corticosteron-Sekretion der unstimulierten Kontrolltiere (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Stimulationsbedingung (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.4.2 Corticosteron-Sekretion im Zeitverlauf

Unter ACTH-Stimulation zeigte sich bei den immunisierten Tieren an Tag 55 eine signifikant verminderte Corticosteron-Sekretion im Vergleich zu den unstimulierten Kontrolltieren von Tag 5/28/55. Die CIA-Tiere zeigten auch gegenüber den Kontrolltieren an Tag 55 eine verminderte Corticosteron-Sekretion während ACTH-Stimulation (Abbildung 19).

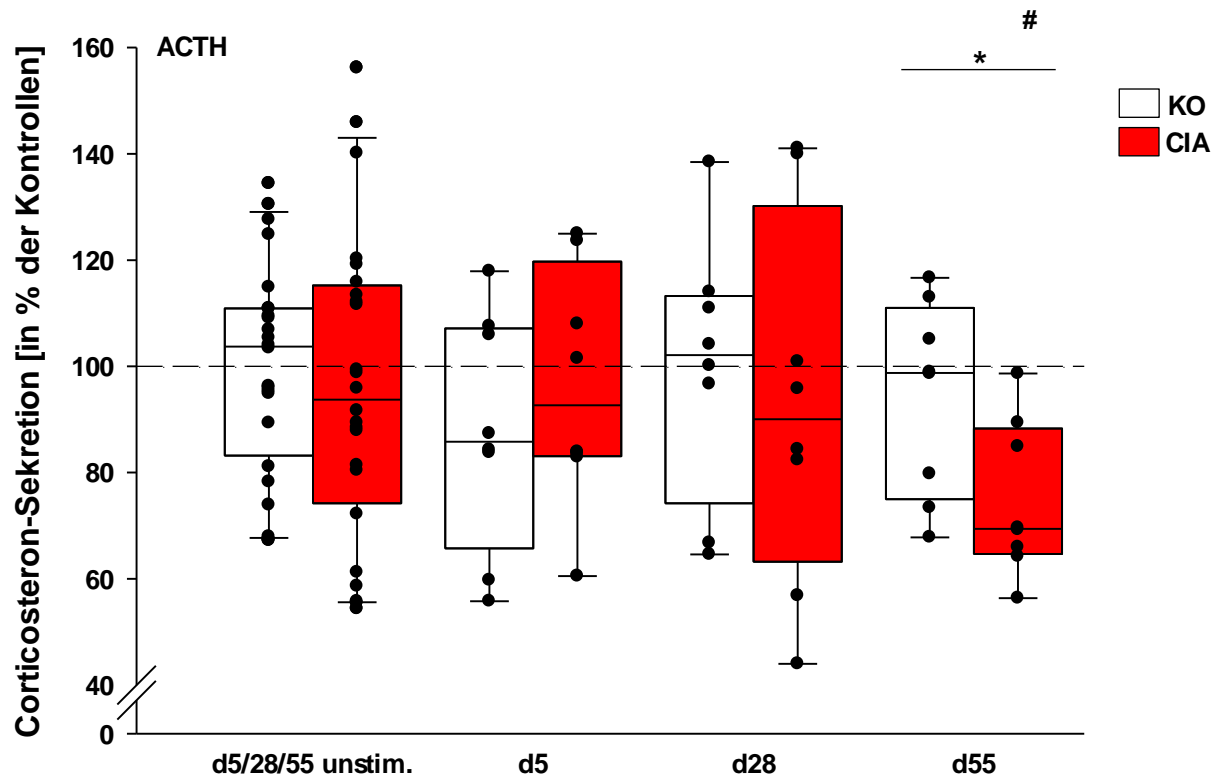


Abbildung 19: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,005$; im Vergleich zu der Corticosteron-Sekretion der unstimulierten Kontrolltiere (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Nebennieren der CIA-Tiere, die mit 1ng/ml IL-1 β inkubiert wurden, zeigten an Tag 5 eine signifikant erhöhte und an Tag 55 eine signifikant verminderte Corticosteron-Sekretion gegenüber den unstimulierten Kontrolltieren aller Tage. Im direkten Vergleich an Tag 55 war die Corticosteron-Sekretion der CIA-Tiere niedriger als die der Kontrolltiere (Abbildung 20).

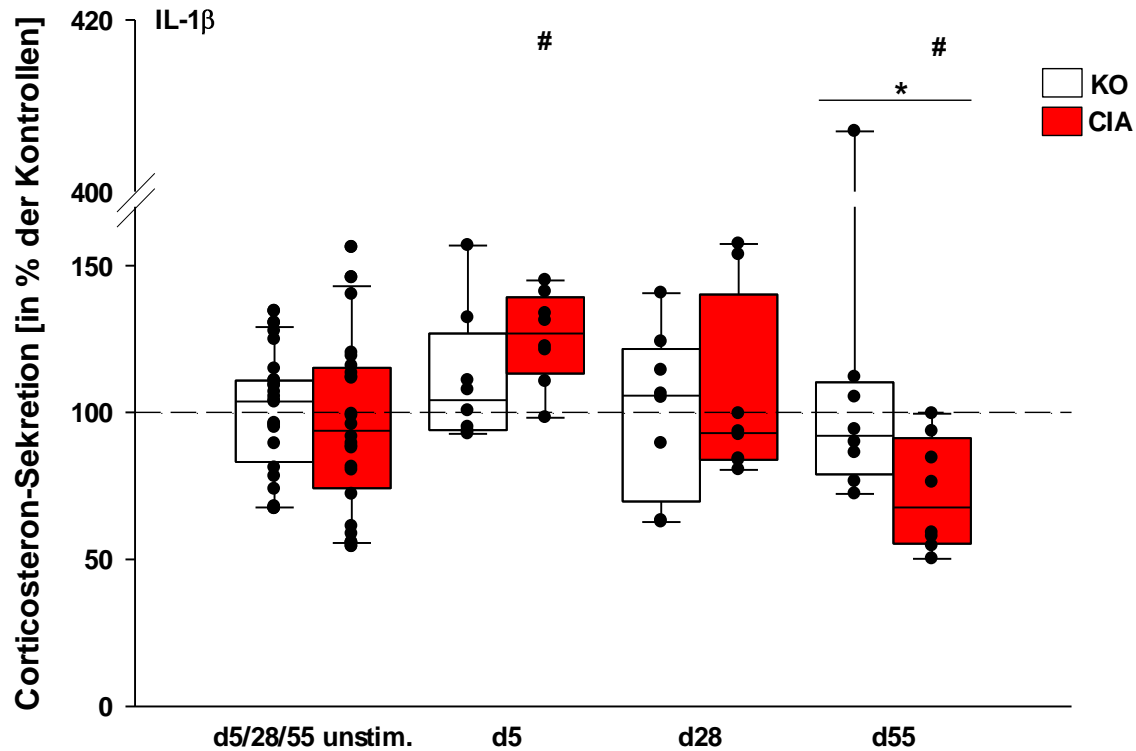


Abbildung 20: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p<0,05; # = p<0,005; im Vergleich zu der Corticosteron-Sekretion der unstimulierten Kontrolltiere (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am fünften Tag nach Immunisierung der Tiere zeigten deren mit ACTH und IL-1 β inkubierten Nebennieren eine signifikant höhere Corticosteron-Sekretion als die Nebennieren der Tiere ohne Immunisierung von Tag 5/28/55. Dieser Effekt kehrte sich an Tag 55 nach Immunisierung ins Gegenteil um (Abbildung 21).

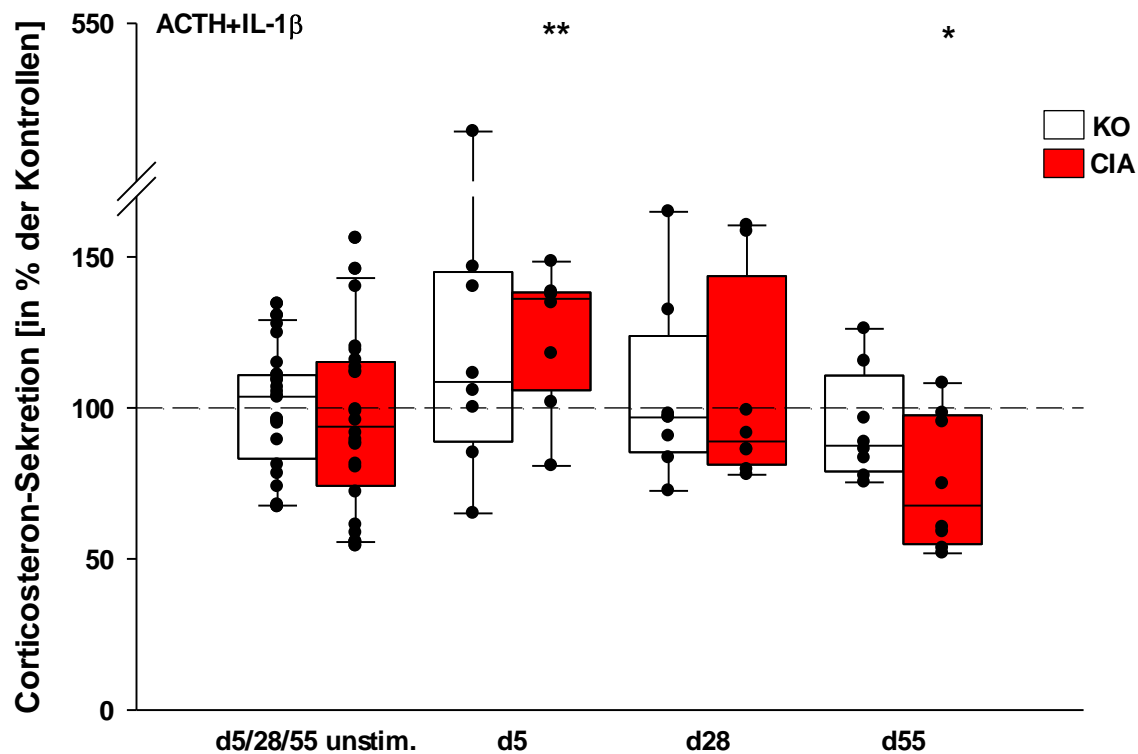


Abbildung 21: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH+IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; im Vergleich zu der Corticosteron-Sekretion der unstimulierten Kontrolltiere (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.5 Bestimmung der CINC-Sekretion während und nach der O₂-Messung am explantierten Organ

Die Nebennieren, die für die O₂-Messung verwendet wurden, unterlagen verschiedenen Stimulationsbedingungen (Abbildung 7).

3.5.1 CINC-1-Sekretion je Versuchstag

Am ersten Tag nach Immunisierung zeigten die Nebennieren der CIA-Tiere, die mit IL-1 β oder ACTH und IL-1 β stimuliert wurden, eine signifikant höhere CINC-1-Sekretion als die Nebennieren der unstimulierten Kontrolltiere (Abbildung 22).

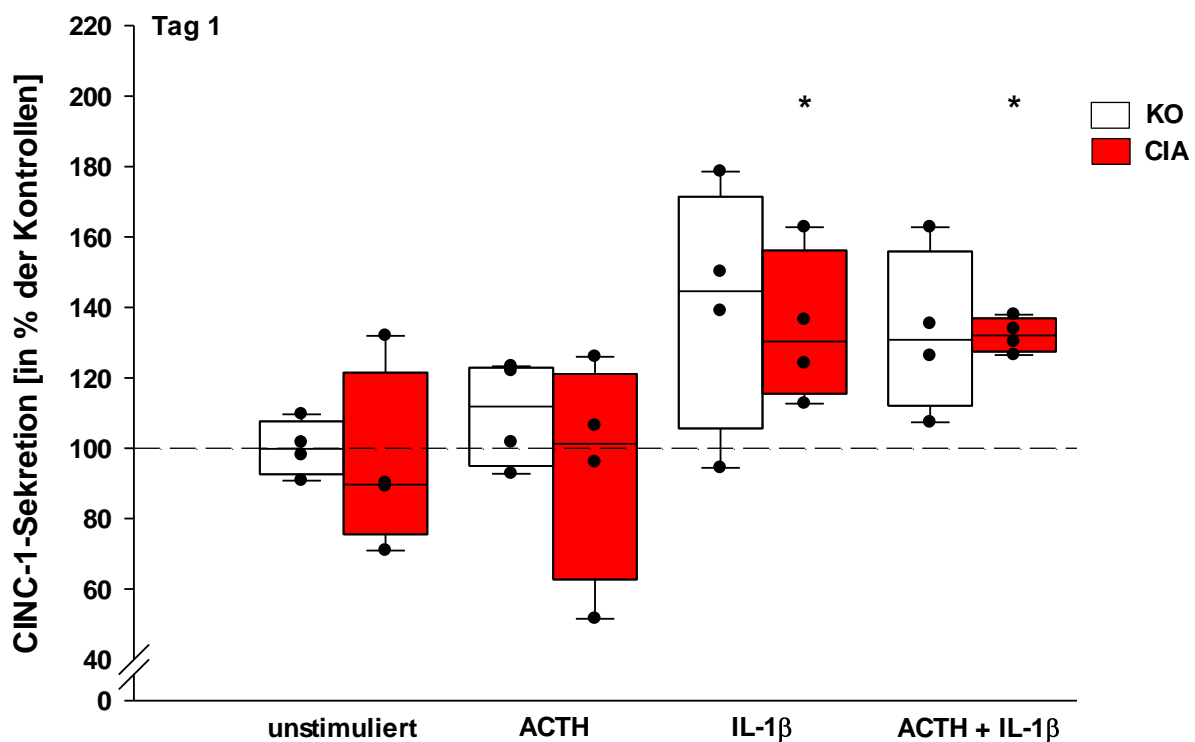


Abbildung 22: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 1. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Nebennieren der CIA-Tiere, welche an Tag 5 mit ACTH und IL-1 β inkubiert wurden, sezernierten signifikant mehr CINC-1 als die unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 23).

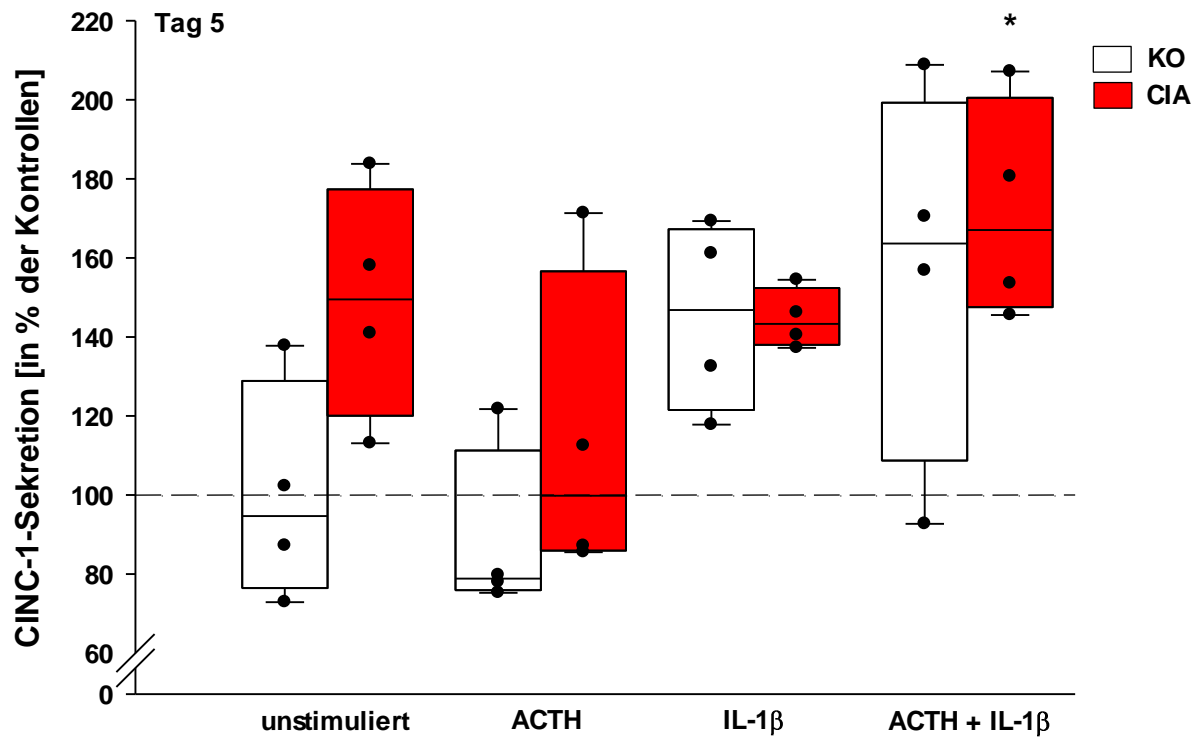


Abbildung 23: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am vierzehnten Tag nach Immunisierung sezernierten sowohl die Nebennieren der CIA- als auch der Kontrolltiere unter IL-1 β -Stimulation signifikant mehr CINC-1 als die Nebennieren der unstimulierten Kontrolltiere (Abbildung 24).

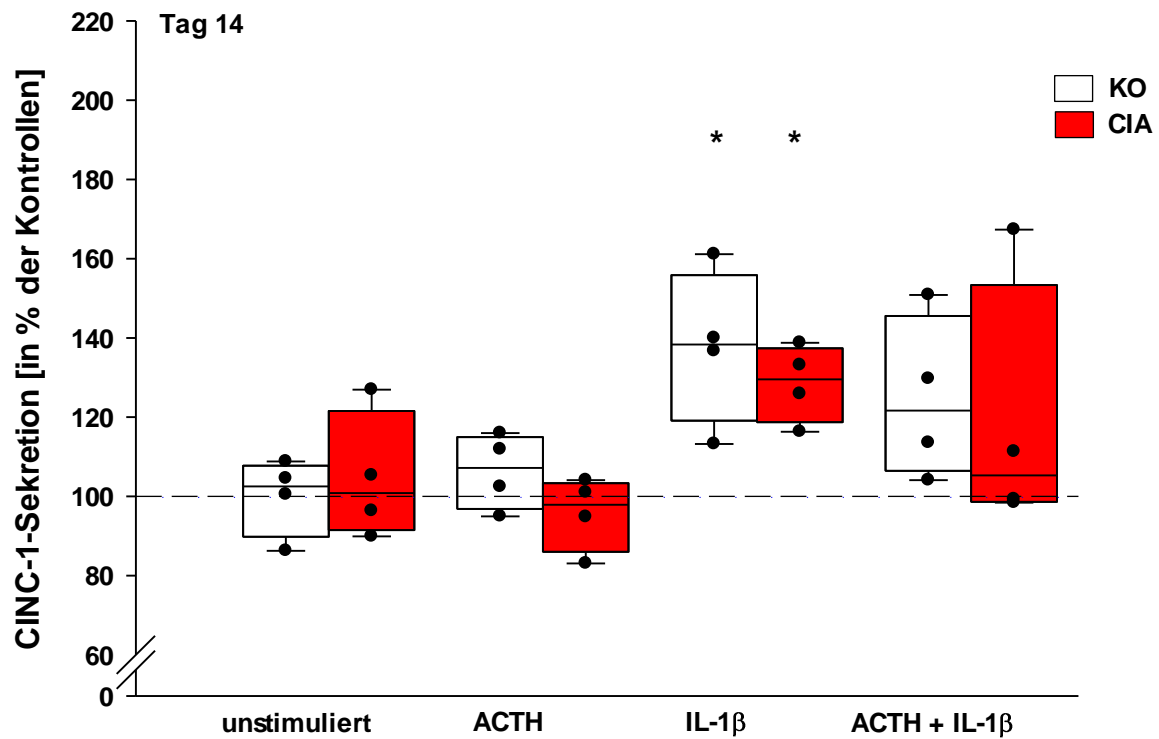


Abbildung 24: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 14. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p < 0,05; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Vier Wochen nach Immunisierung zeigten sich keine statistischen Unterschiede in der CINC-1-Sekretion zwischen den einzelnen Stimulationsbedingungen (Abbildung 25).

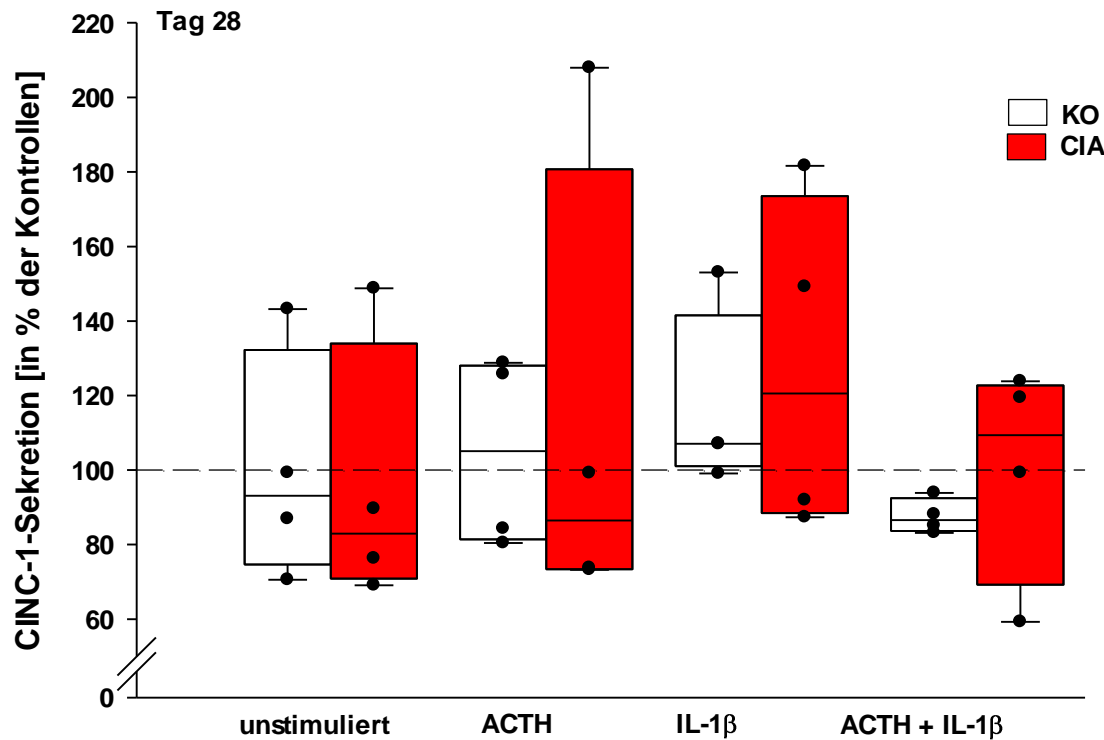


Abbildung 25: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am vierzigsten Tag nach Immunisierung führte die Stimulation der Nebennieren mit IL-1 β zu einer signifikanten Steigerung der CINC-1-Sekretion sowohl bei den CIA- als auch bei den Kontrolltieren gegenüber den unstimulierten Kontrolltieren. Innerhalb dieser Mehrsekretion zeigten die mit IL-1 β -stimulierten Nebennieren der CIA-Tiere nochmal eine signifikante Steigerung der CINC-1-Sekretion gegenüber den IL-1 β -stimulierten Nebennieren der Kontrolltiere. Die Nebennieren der CIA-Tiere, welche mit ACTH und IL-1 β stimuliert wurden, zeigten ebenfalls signifikant höhere CINC-1-Konzentrationen als die unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 26).

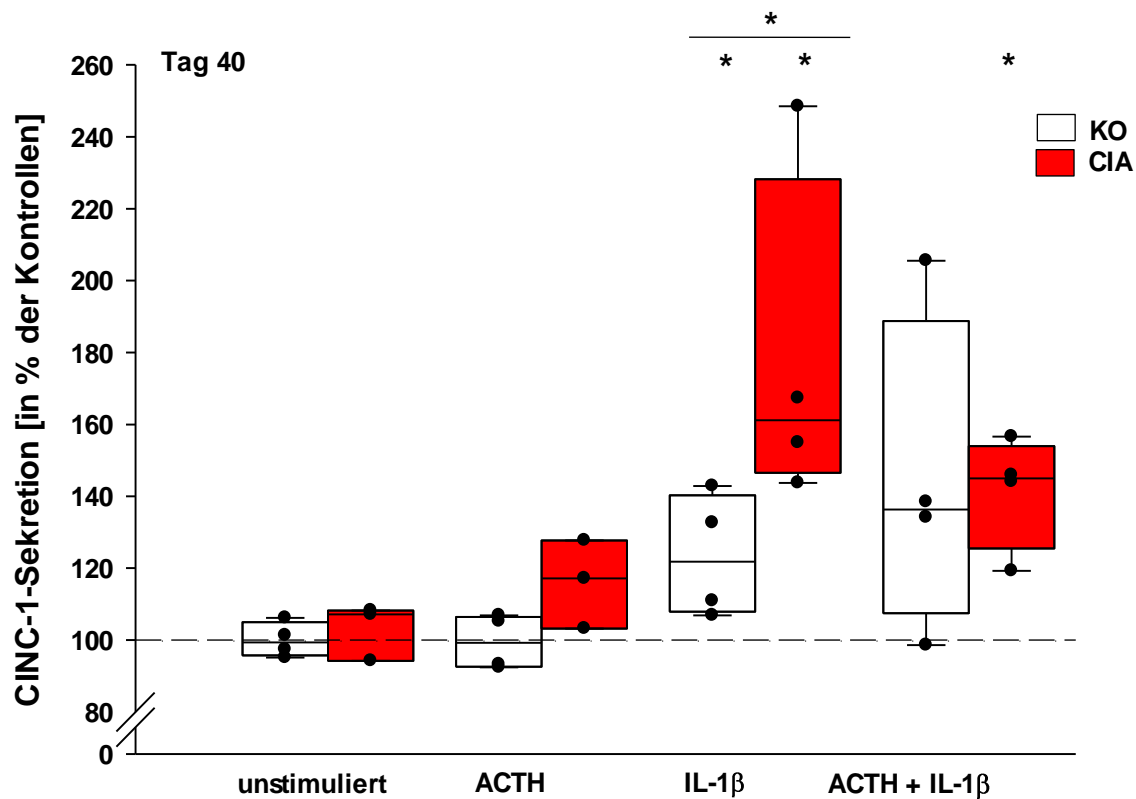


Abbildung 26: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 40. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Stimulationsbedingung (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am fünfundfünfzigsten Tag nach Immunisierung zeigten sich keine statistischen Unterschiede in der CINC-1-Sekretion zwischen den einzelnen Stimulationsbedingungen (Abbildung 27).

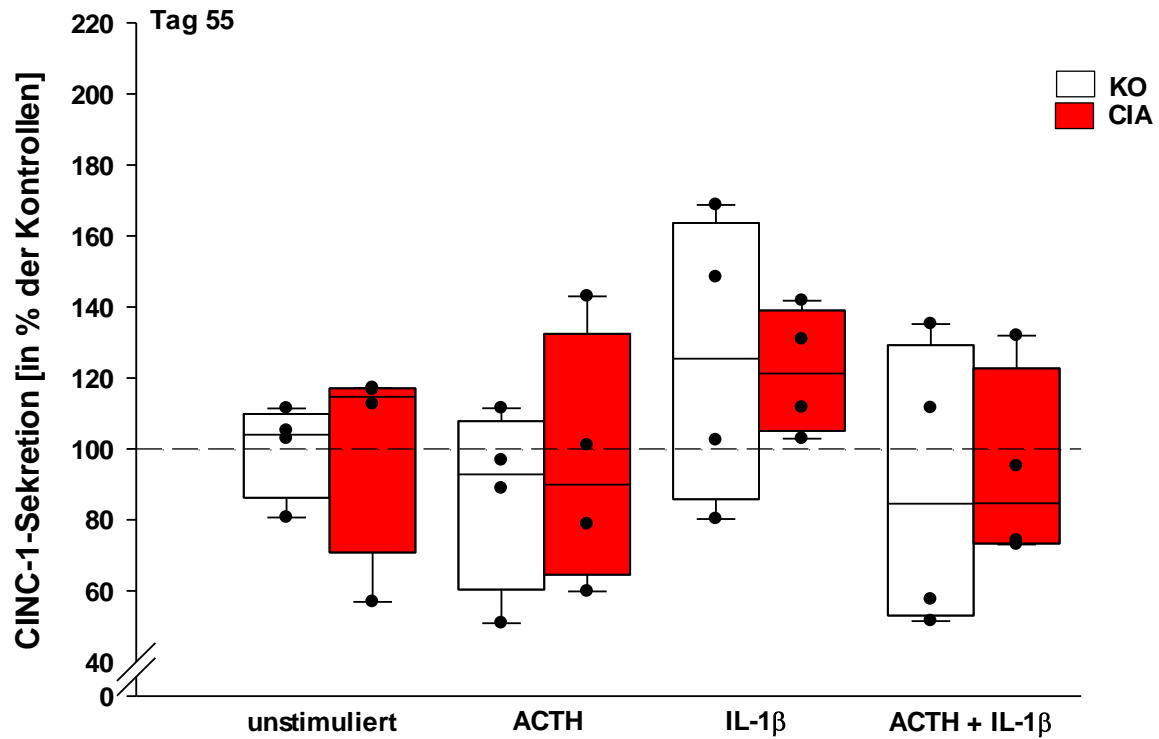


Abbildung 27: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.5.2 CINC-1-Sekretion im Zeitverlauf

Der alleinige Einfluss von ACTH auf die Nebennieren sowohl von CIA- als auch von Kontrolltieren bewirkte keine signifikante Veränderung der CINC-1-Sekretion (Abbildung 28).

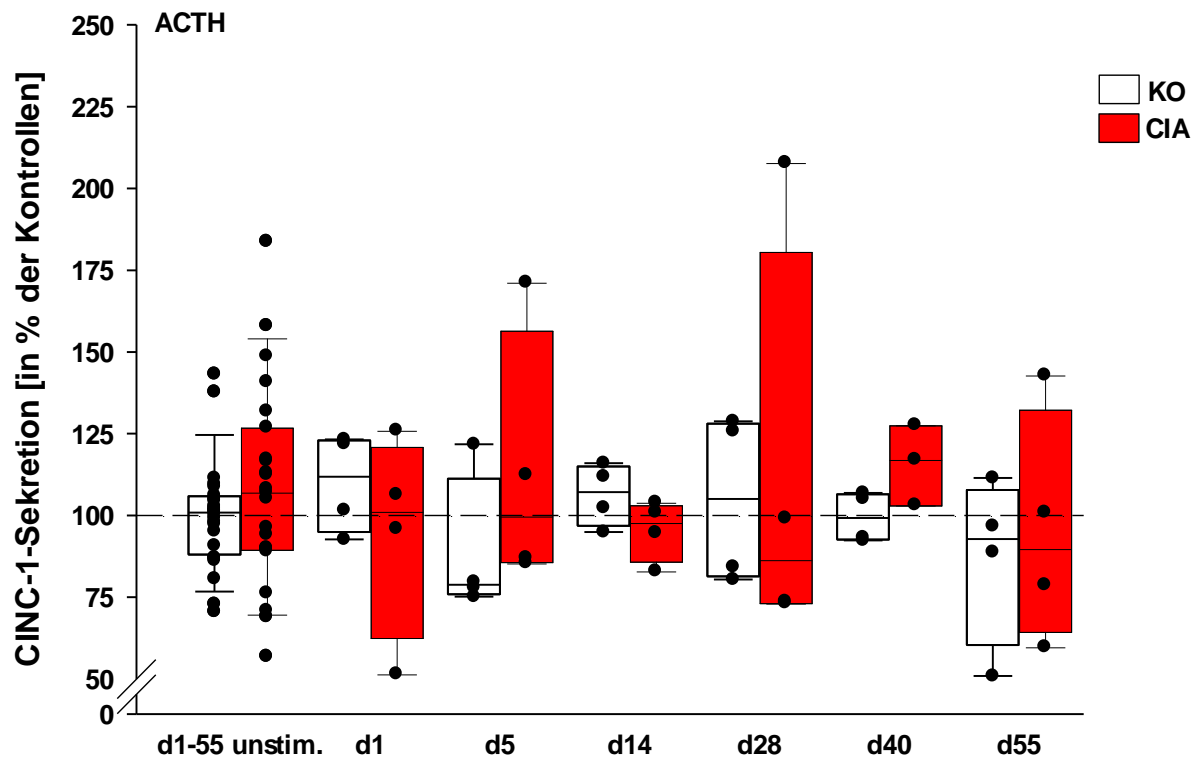


Abbildung 28: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Einwirkung von IL-1 β auf die Nebennieren der CIA-Tiere bewirkte an allen Versuchstagen (außer an Tag 28) nach Immunisierung eine signifikante Mehrproduktion von CINC-1. Einen ähnlichen Effekt konnte man bei den Kontrolltieren an den Tagen 5, 14 und 40 erkennen (Abbildung 29). An Versuchstag 40 sezernierten die Nebennieren der CIA-Tiere unter IL-1 β -Stimulation signifikant mehr CINC-1 als die Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 29).

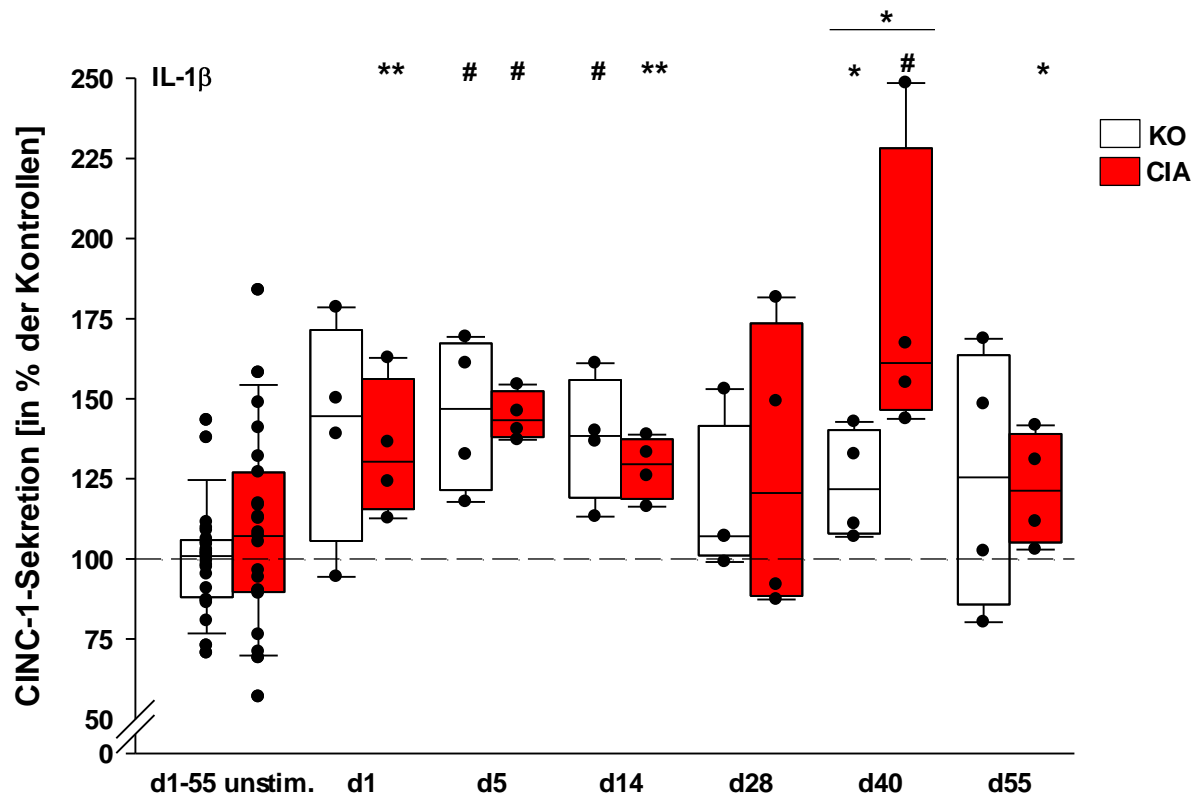


Abbildung 29: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Unter Einwirkung von ACTH und IL-1 β zeigten die Nebennieren der CIA-Tiere verglichen mit den unstimulierten Kontrolltieren an Tag 1, 5 und 40 eine signifikante Mehrproduktion von CINC-1. Eine erhöhte CINC-1-Sekretion beobachtete man auch an den Tagen 1, 5, 14 und 40 bei den ACTH- und IL-1 β -stimulierten Nebennieren der Kontrolltiere gegenüber den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 30).

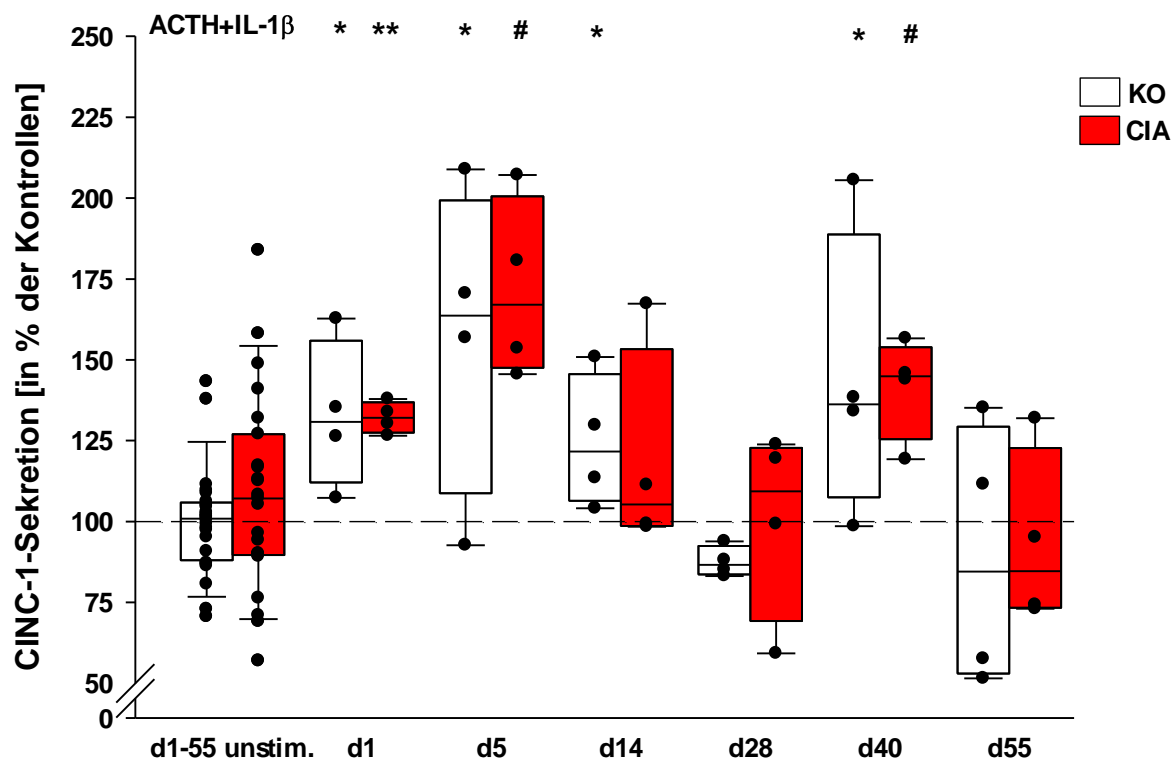


Abbildung 30: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH+IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 4 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.5.3 CINC-3-Sekretion je Versuchstag

Die Nebennieren sowohl der CIA- als auch der Kontrolltiere sezernierten an Tag 1 unter IL-1 β - oder ACTH und IL-1 β -Stimulation signifikant mehr CINC-3 als die Nebennieren der unstimulierte Kontrolltiere (Abbildung 31).

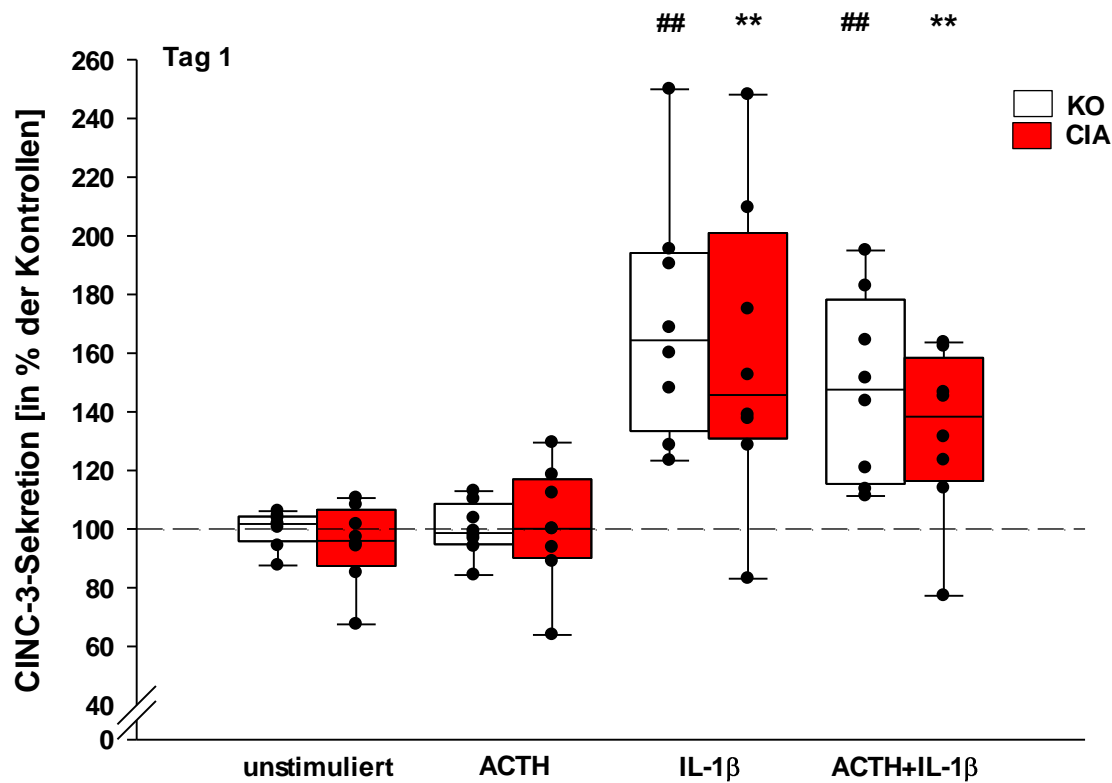


Abbildung 31: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 1. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: ** = $p < 0,01$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am fünften Tag nach Immunisierung zeigten ebenfalls CIA- und Kontrolltiere unter IL-1 β - oder ACTH und IL-1 β -Stimulation signifikant höhere CINC-3-Werte als die Nebennieren der unstimulierten Kontrolltiere (Abbildung 32).

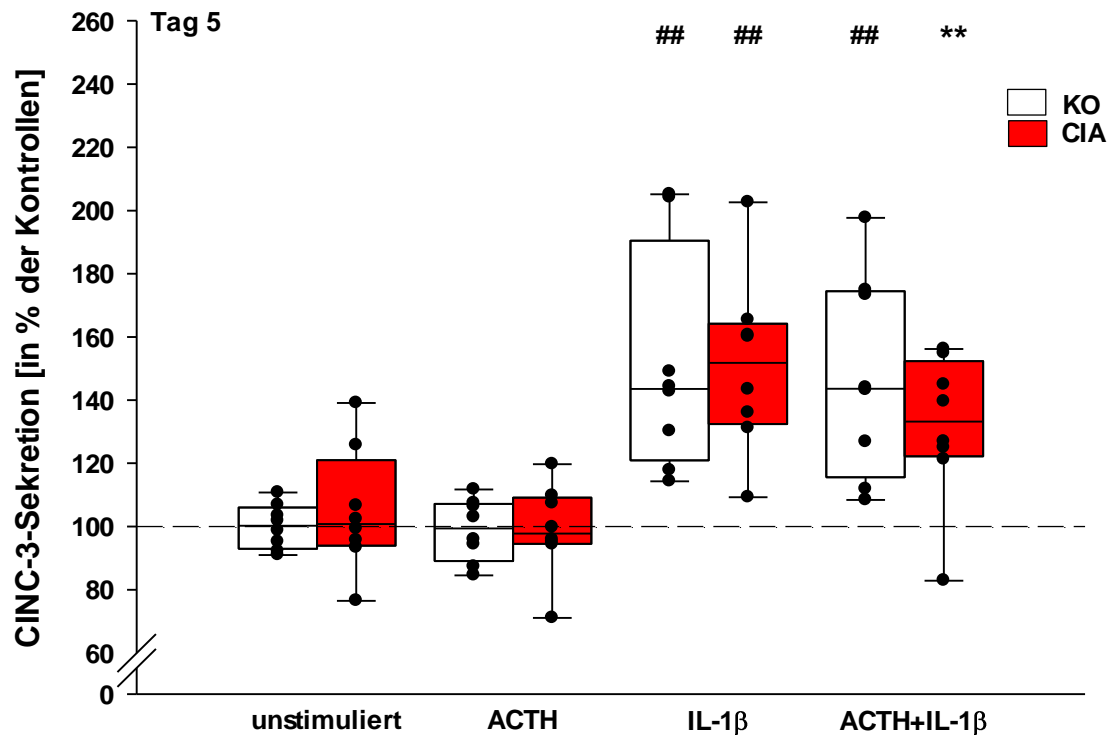


Abbildung 32: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: ** = $p < 0,01$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

An Tag 14 nach Immunisierung zeigte sich nur bei den IL-1 β - oder ACTH- und IL-1 β -stimulierten Nebennieren der Kontrolltiere eine signifikant erhöhte CINC-3-Sekretion, während die Nebennieren der CIA-Tiere im Vergleich zu den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere nur die Tendenz dazu hatten (Abbildung 33).

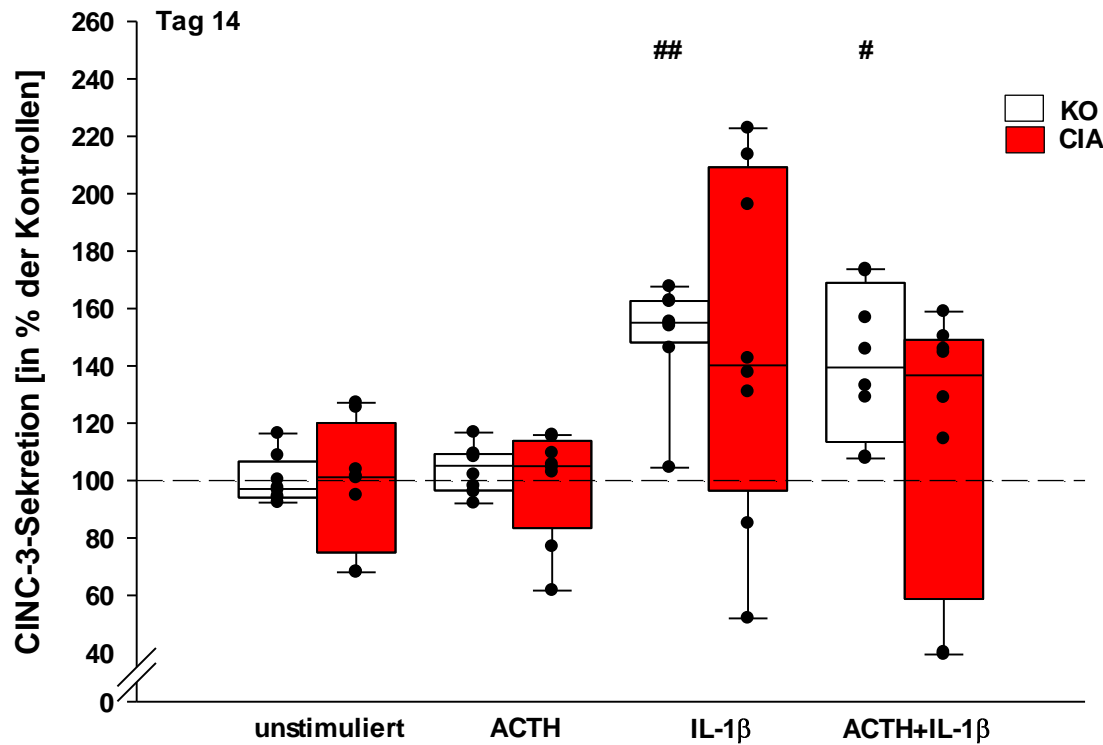


Abbildung 33: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 14. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Genau vier Wochen nach Immunisierung der Tiere zeigten nur die Nebennieren der nicht-immunisierten Kontrolltiere unter allen Stimulationsbedingungen eine signifikant erhöhte CINC-3-Sekretion (Abbildung 34).

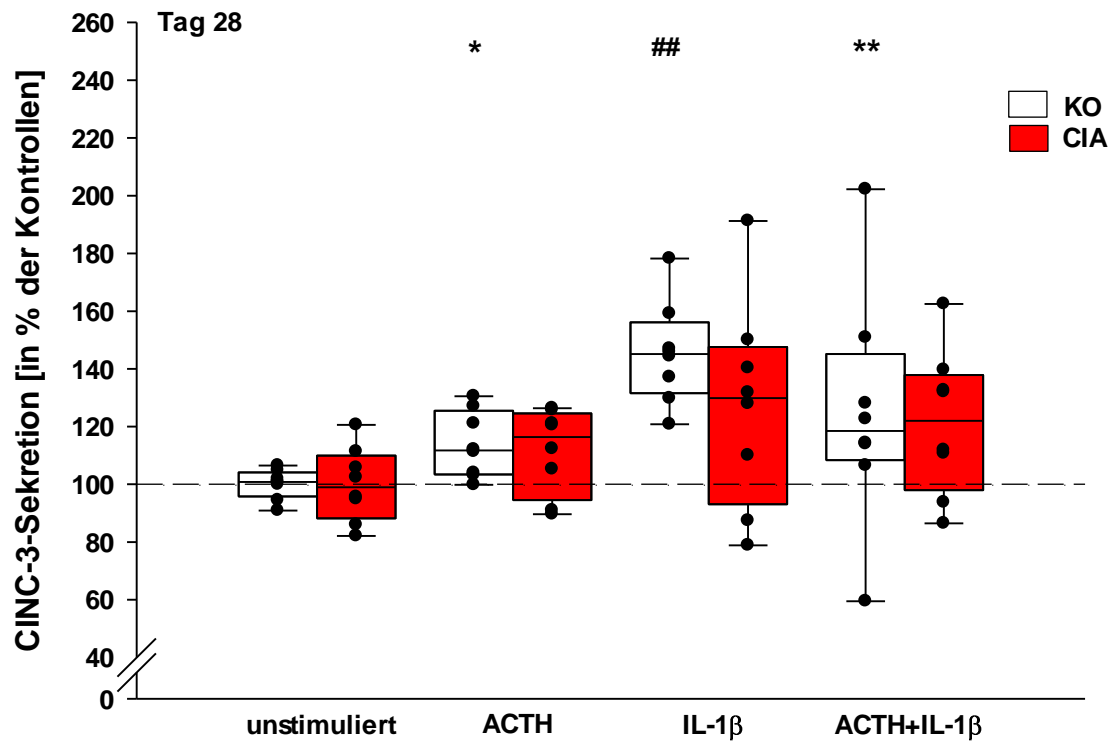


Abbildung 34: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Am vierzigsten Tag nach Immunisierung konnte man lediglich bei den ACTH und IL-1 β -stimulierten Nebennieren der Kontrolltiere eine signifikant erhöhte CINC-3-Sekretion gegenüber den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere beobachten (Abbildung 35).

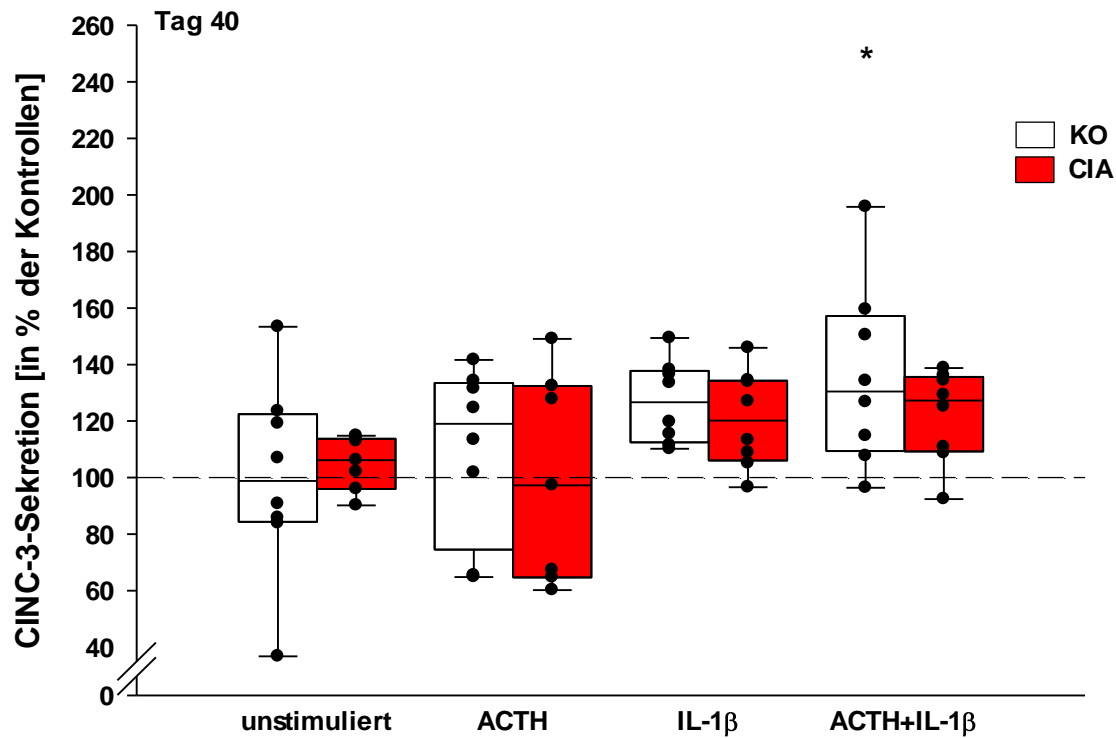


Abbildung 35: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 40. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p<0,05; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

An Tag 55 nach Immunisierung konnte man während IL-1 β -Stimulation sowohl bei den Nebennieren der Kontrolltiere als auch der CIA-Tiere eine signifikant höhere CINC-3-Sekretion beobachten. ACTH bewirkte zu diesem Versuchszeitpunkt bei Nebennieren der CIA-Tiere eine Mindersekretion von CINC-3 (Abbildung 36).

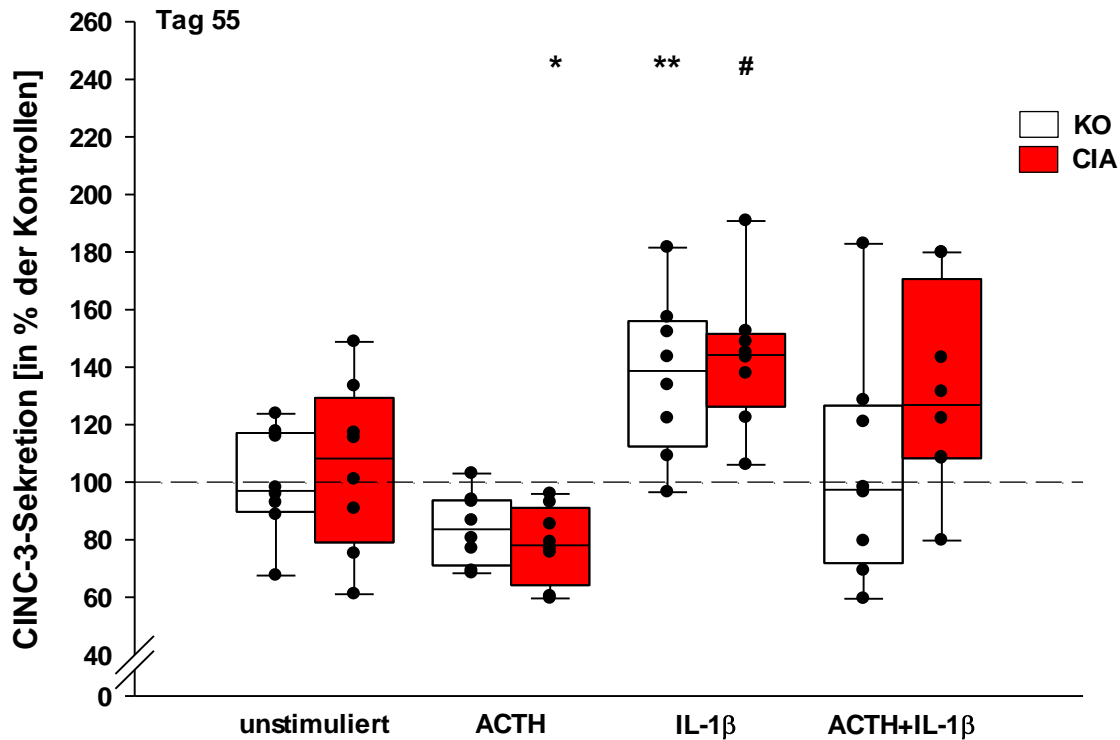


Abbildung 36: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p<0,05; ** = p<0,01; # = p<0,005; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.5.4 CINC-3-Sekretion im Zeitverlauf

Unter ACTH-Einwirkung zeigten nur die Nebennieren der Kontrolltiere an Tag 28 eine erhöhte CINC-3-Sekretion verglichen mit den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere aller Tage. Eine signifikante Minderproduktion von CINC-3 beobachtete man unter ACTH-Stimulation an Tag 55 bei sowohl Kontroll- als auch CIA-Tieren (Abbildung 37).

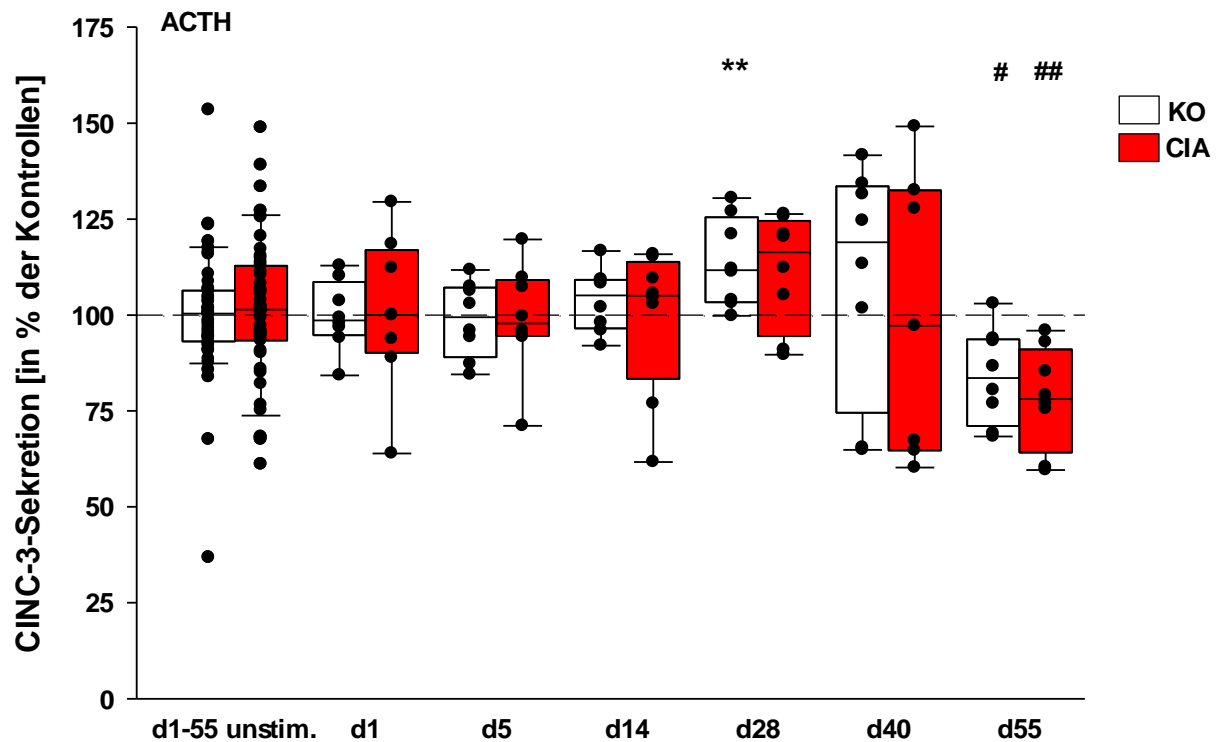


Abbildung 37: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Eine IL-1 β -Stimulation vermochte an allen untersuchten Tagen die Nebennieren von Kontroll- und CIA-Tieren zu vermehrter CINC-3-Sekretion anzuregen (Abbildung 38).

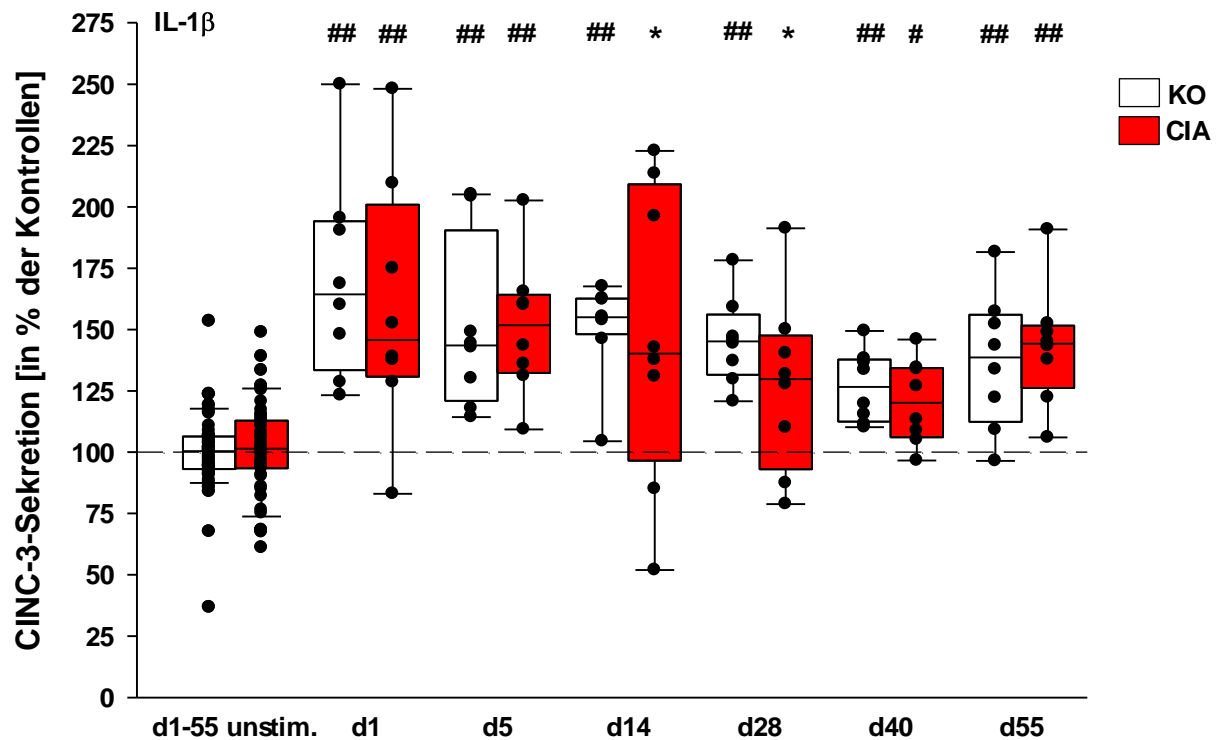


Abbildung 38: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = p<0,05; # = p<0,005; ## = p<0,001; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Nebennieren aller Tiere zeigten an allen Tagen (außer die Kontrolltiere an Tag 55) eine signifikante Mehrsekretion von CINC-3 unter ACTH und IL-1 β -Stimulation (Abbildung 39).

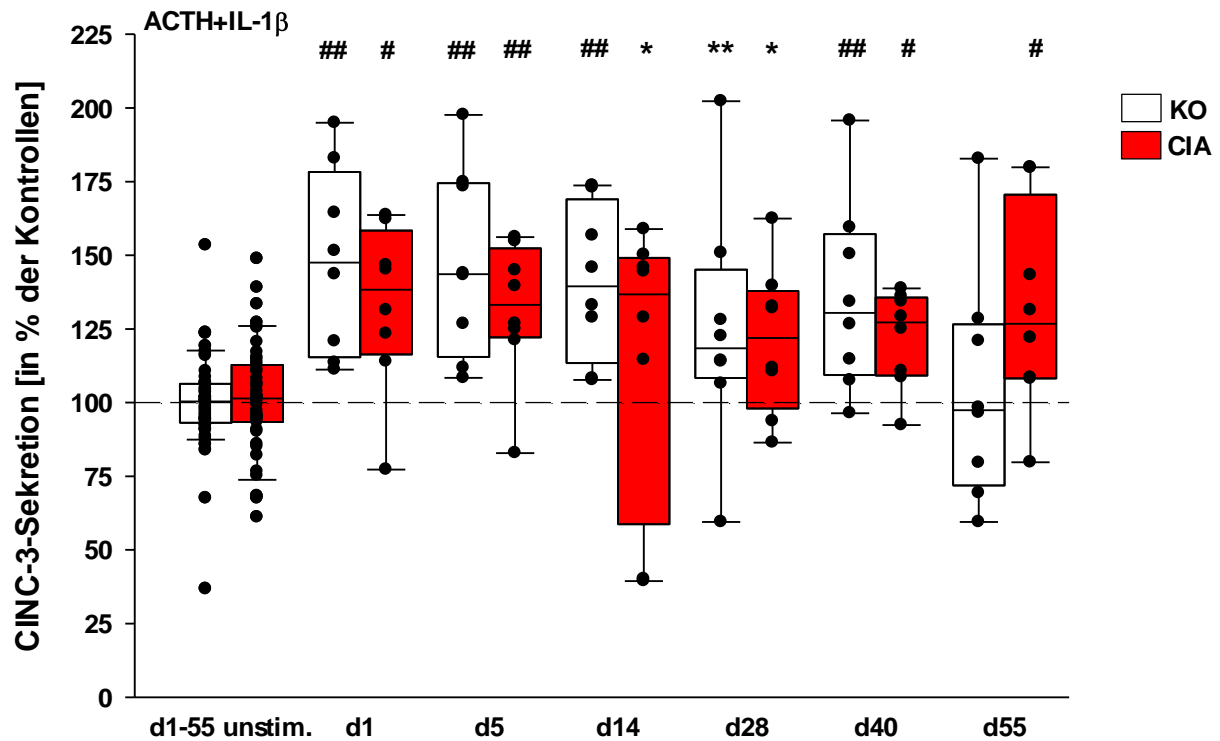


Abbildung 39: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH+IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.6 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren im Verlauf der experimentellen Arthritis

3.6.1 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren je Versuchstag

An Tag 1 beobachtete man keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen stimulierten Nebennieren und unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 40).

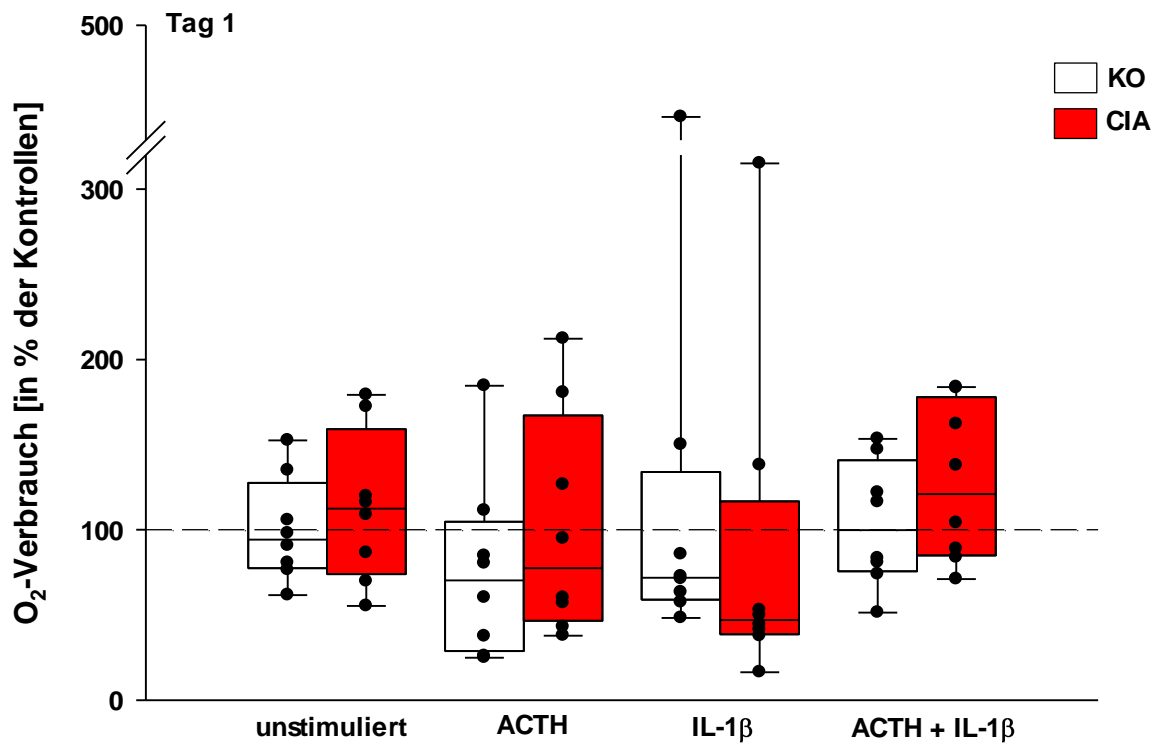


Abbildung 40: Sauerstoffverbrauch an Tag 1. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

An Versuchstag 5 beobachtete man während Stimulation der Nebennieren der CIA-Tiere mit ACTH einen signifikanten Mehrverbrauch an Sauerstoff gegenüber unstimulierten Kontrolltieren und auch gegenüber Kontrolltieren, deren Nebennieren ebenfalls mit ACTH inkubiert wurden (Abbildung 41).

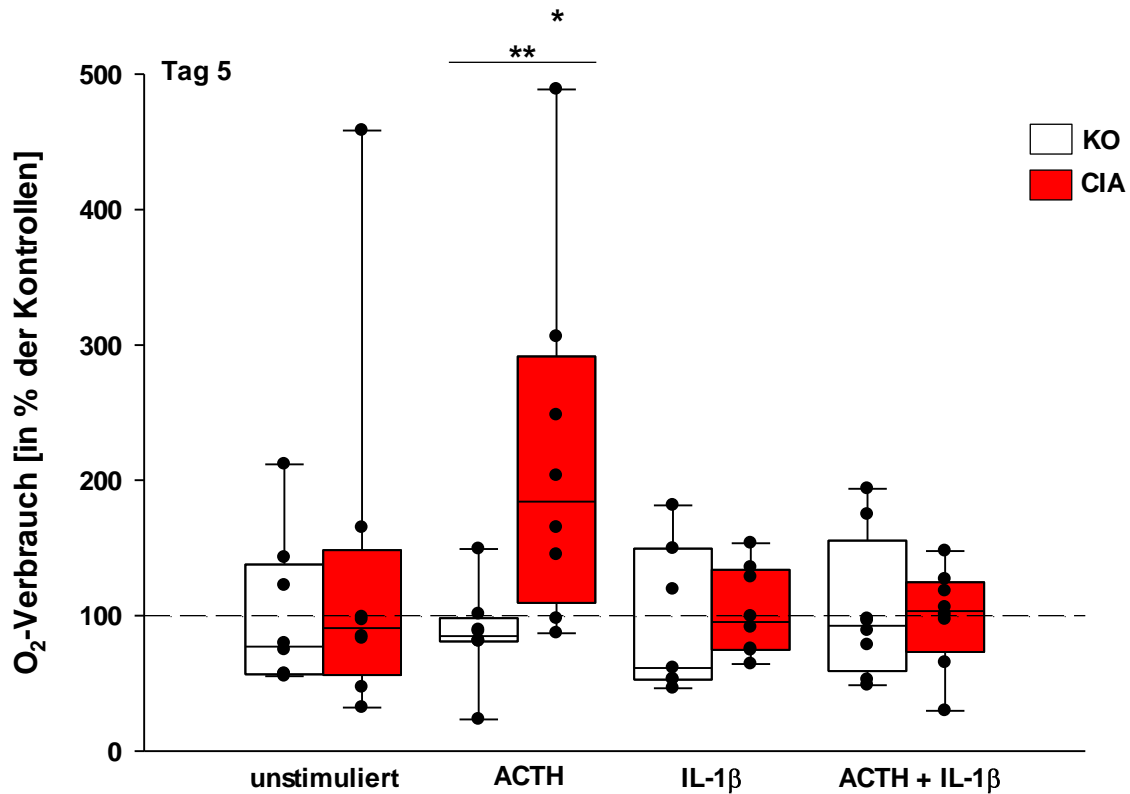


Abbildung 41: Sauerstoffverbrauch an Tag 5. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Zwei Wochen nach Immunisierung zeigte sich im Sauerstoffverbrauch der Nebennieren der Kontrolltiere unter ACTH-Stimulation eine signifikante Minderung sowohl gegenüber ACTH stimulierten Nebennieren der CIA-Tiere als auch gegenüber unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 42).

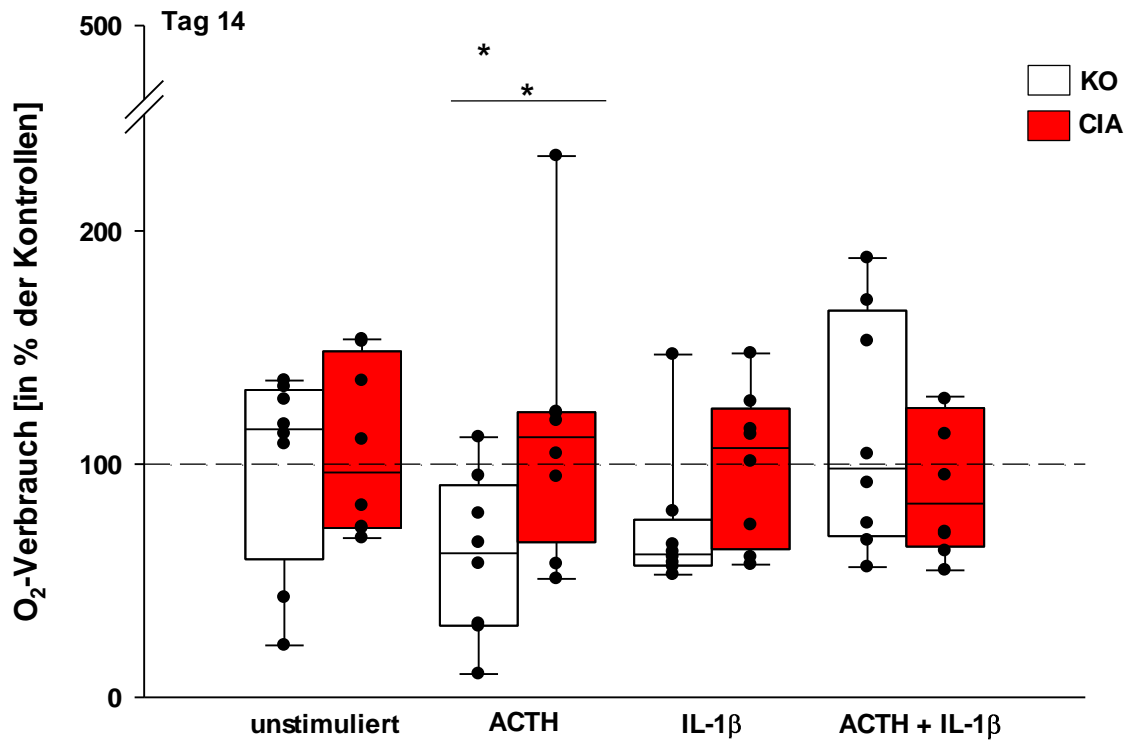


Abbildung 42: Sauerstoffverbrauch an Tag 14. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

An Tag 28 beobachtete man keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen stimulierten Nebennieren und unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 43).

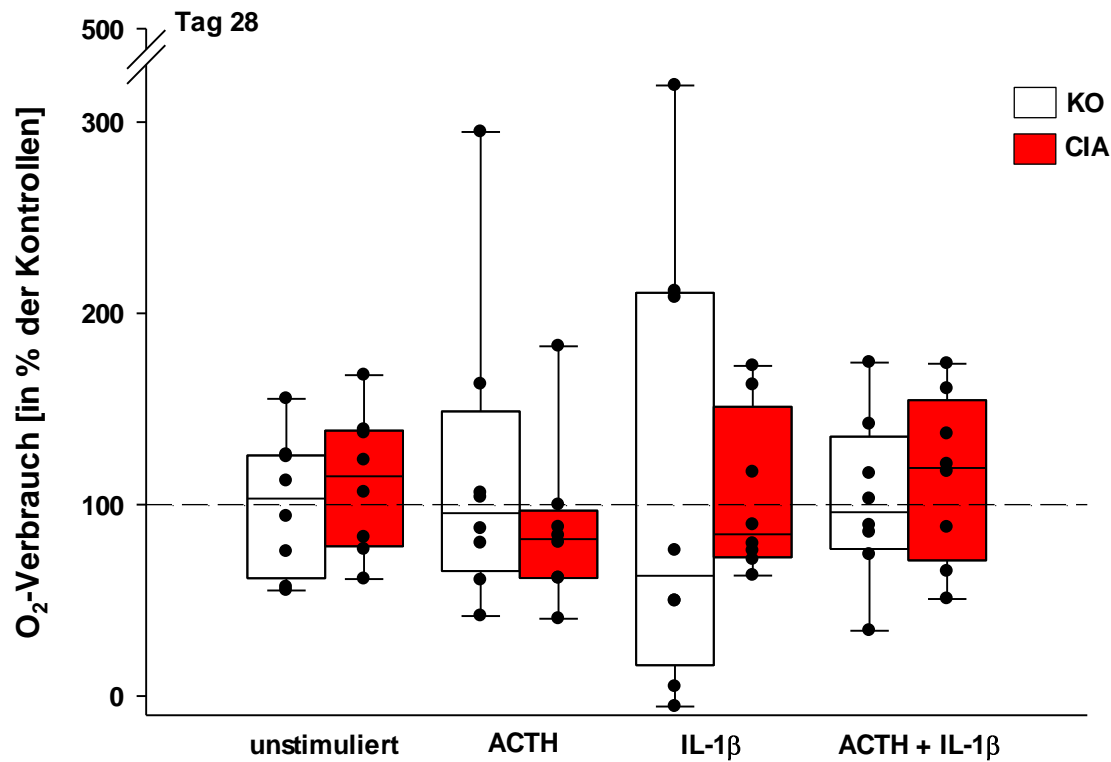


Abbildung 43: Sauerstoffverbrauch an Tag 28. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

An Tag 40 beobachtete man keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen stimulierten Nebennieren und unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 44).

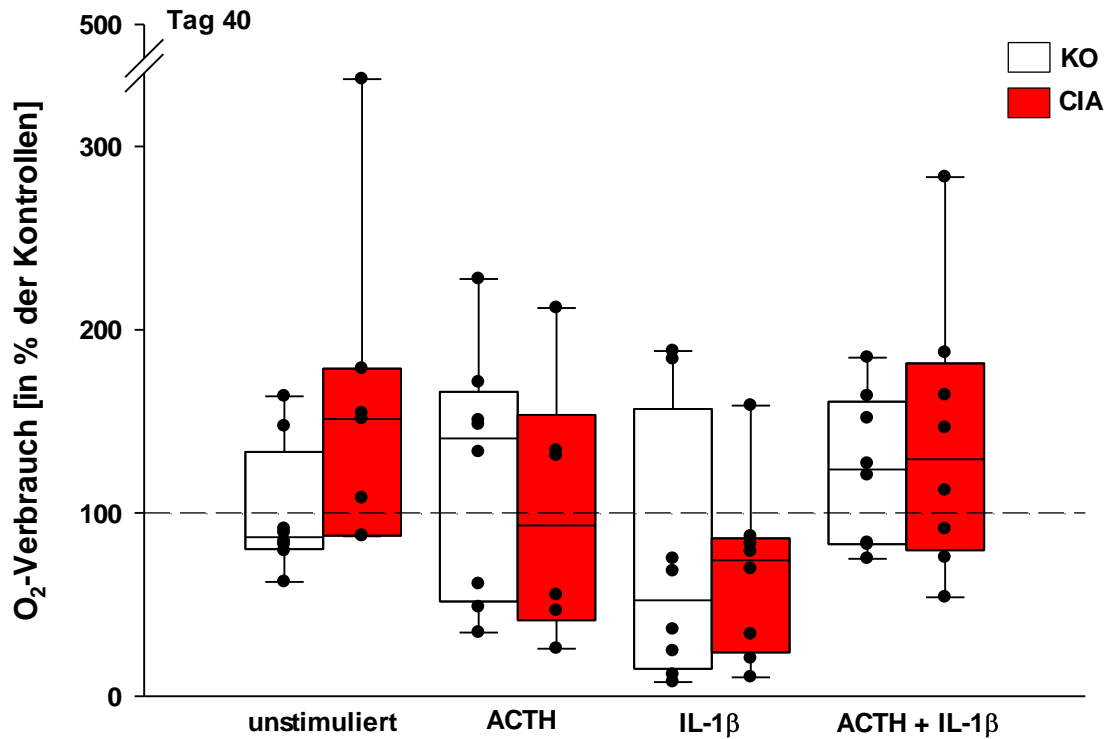


Abbildung 44: Sauerstoffverbrauch an Tag 40. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Bei unstimulierten, IL-1 β stimulierten und ACTH und IL-1 β stimulierten Nebennieren der CIA-Tiere sowie bei IL-1 β stimulierten Nebennieren der Kontrolltiere beobachtete man an Tag 55 nach Immunisierung eine signifikante Minderung des Sauerstoffverbrauchs (Abbildung 45).

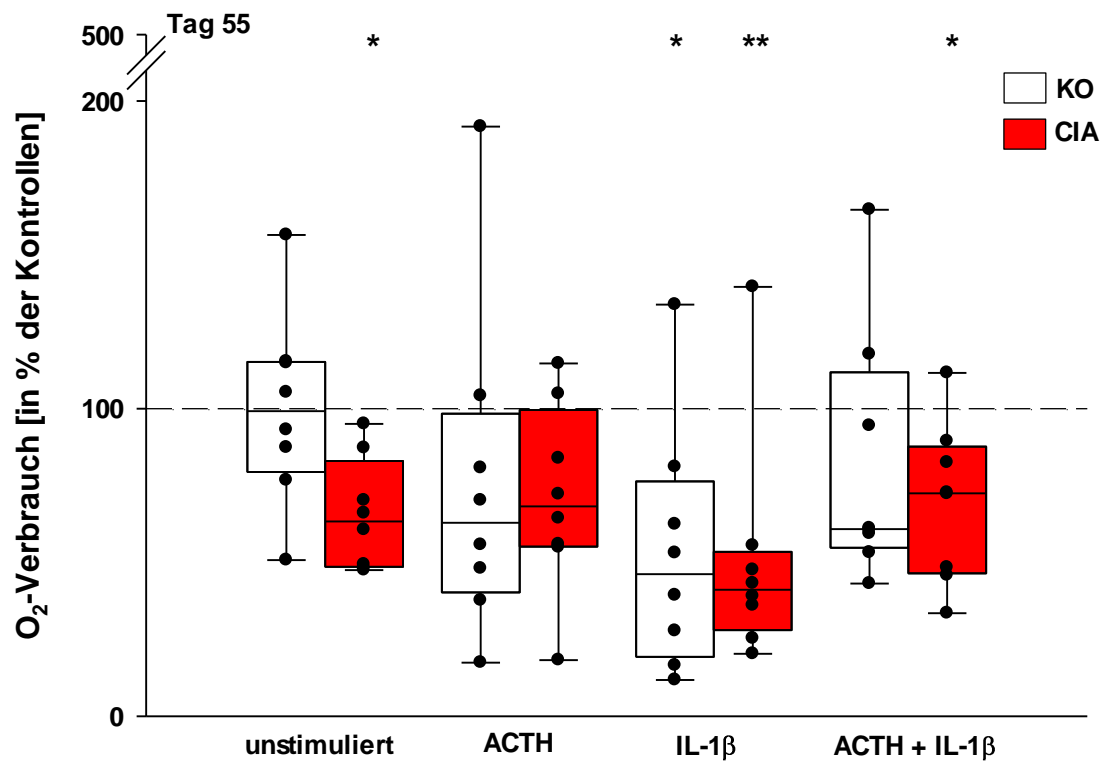


Abbildung 45: Sauerstoffverbrauch an Tag 55. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.6.2 Sauerstoffverbrauch der Nebennieren im Zeitverlauf

Die Nebennieren der CIA-Tiere zeigten an Tag 5 einen erhöhten Sauerstoffverbrauch gegenüber unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere. An Tag 5 und Tag 14 verbrauchten die Nebennieren der immunisierten Tiere mehr Sauerstoff als die Nebennieren der Kontrolltiere der gleichen Tage. Weniger Sauerstoffverbrauch als die Nebennieren der unstimulierten Kontrolltiere war bei den Organen der Kontrolltiere an Tag 14 und der CIA-Tiere an Tag 55 festzustellen (Abbildung 46).

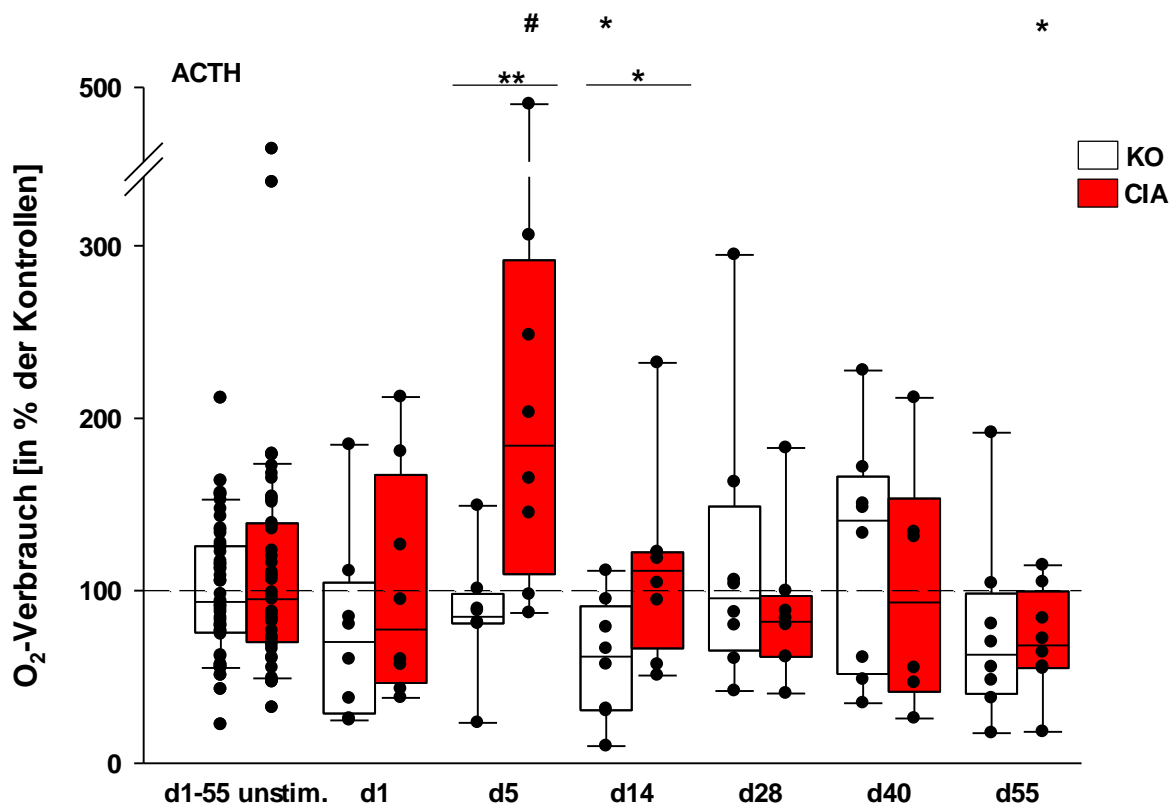


Abbildung 46: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter ACTH-Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%) und im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag (mit horizontalem Strich). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Unter Stimulation mit IL-1 β beobachtete man bei den Nebennieren der CIA-Tiere an Tag 1 und Tag 55, sowie bei den Kontrolltieren an Tag 14 und Tag 55 einen verminderten Sauerstoffverbrauch gegenüber den Nebennieren unstimulierter Kontrolltiere (Abbildung 47).

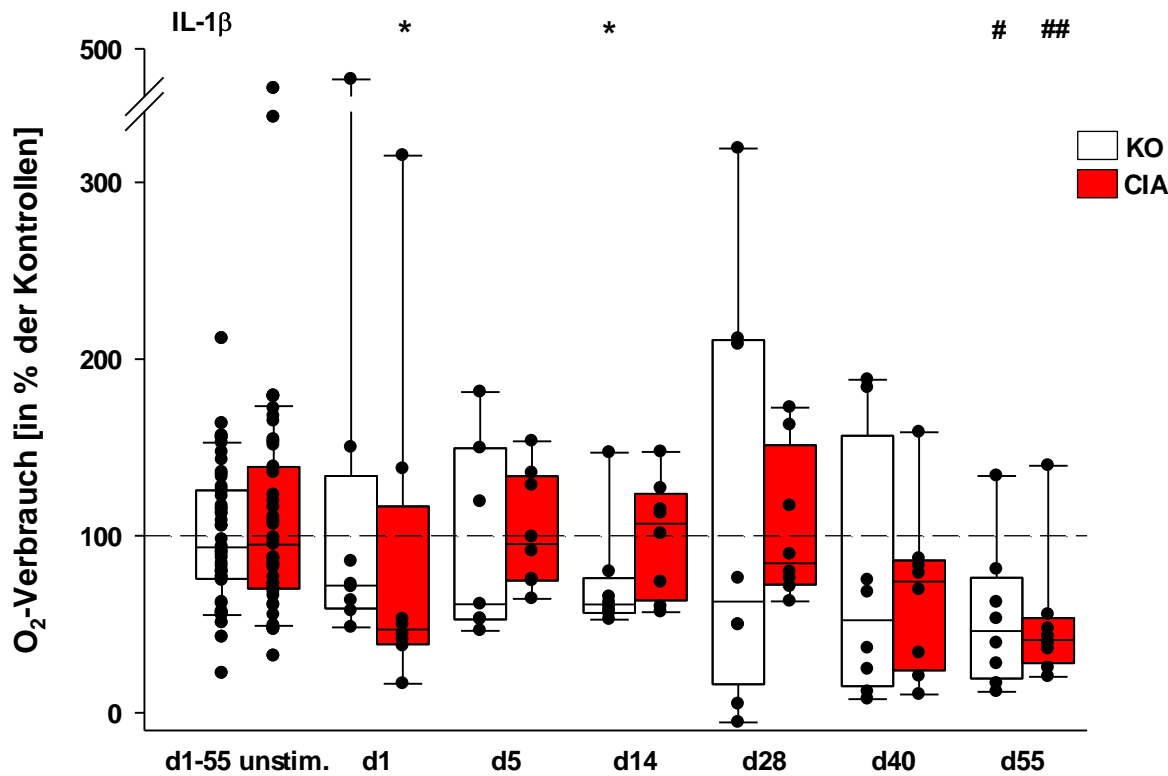


Abbildung 47: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Nebennieren der CIA-Tiere zeigten unter ACTH- und IL-1 β -Stimulation an Tag 55 einen verminderten Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu den unstimulierten Nebennieren der Kontrolltiere aller Tage (Abbildung 48).

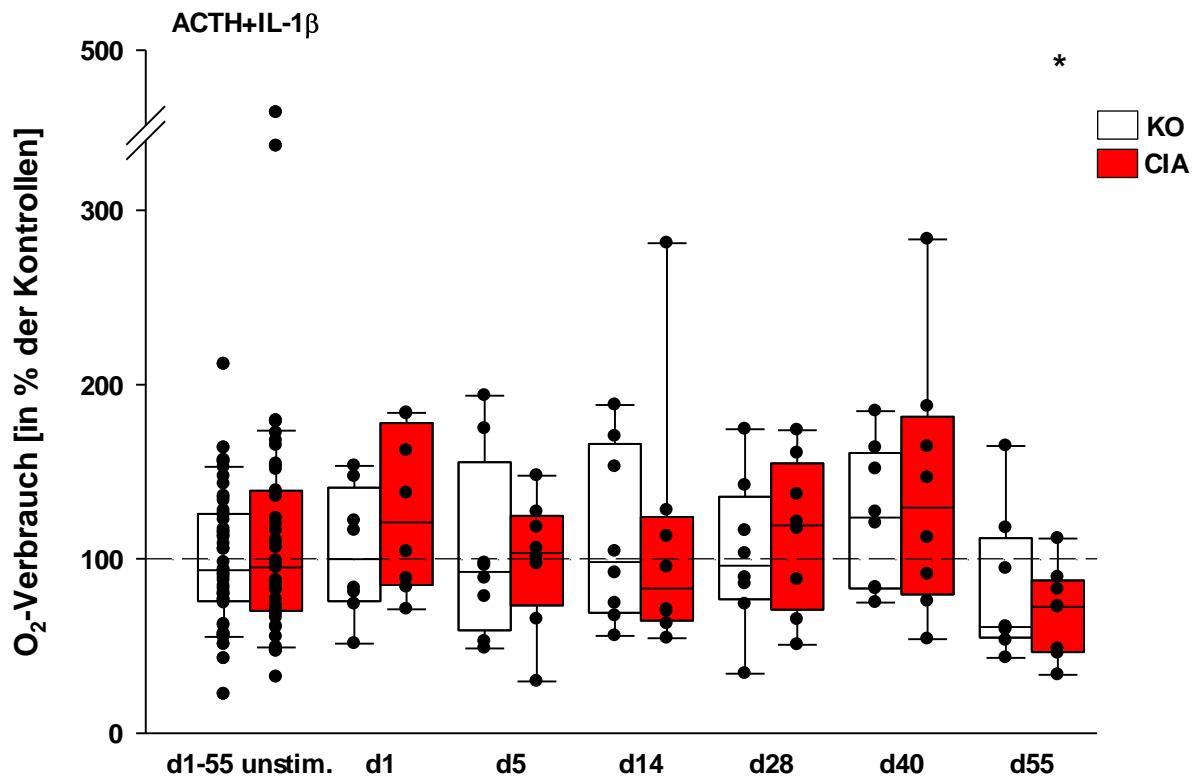


Abbildung 48: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter ACTH+IL-1 β -Stimulation. Es wurden pro Tag und pro Stimulationsbedingung 8 Nebennieren untersucht. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: * = $p < 0,05$; jeweils verglichen mit unstimulierten Nebennieren von Kontrolltieren (100%). Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.7 Zytokinprofil der explantierten und stimulierten Nebennieren (Proteom Profiler)

Aus der Messung der Zytokine in den Überständen der Nebennieren zeigte sich, dass das Protein Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) unabhängig vom Arthritisstatus des Tieres vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 49). Bei CINC-2 α/β und CINC-3 zeigte sich sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren eine Expressionszunahme (Abbildung 49). Fractalkine und sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule 1) wurden von den untersuchten Nebennieren ebenfalls vermehrt exprimiert. Bei CNTF (ciliary neurotrophic factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) waren unter den Stimulationsbedingungen keine relevanten Änderungen detektierbar (Abbildung 49).

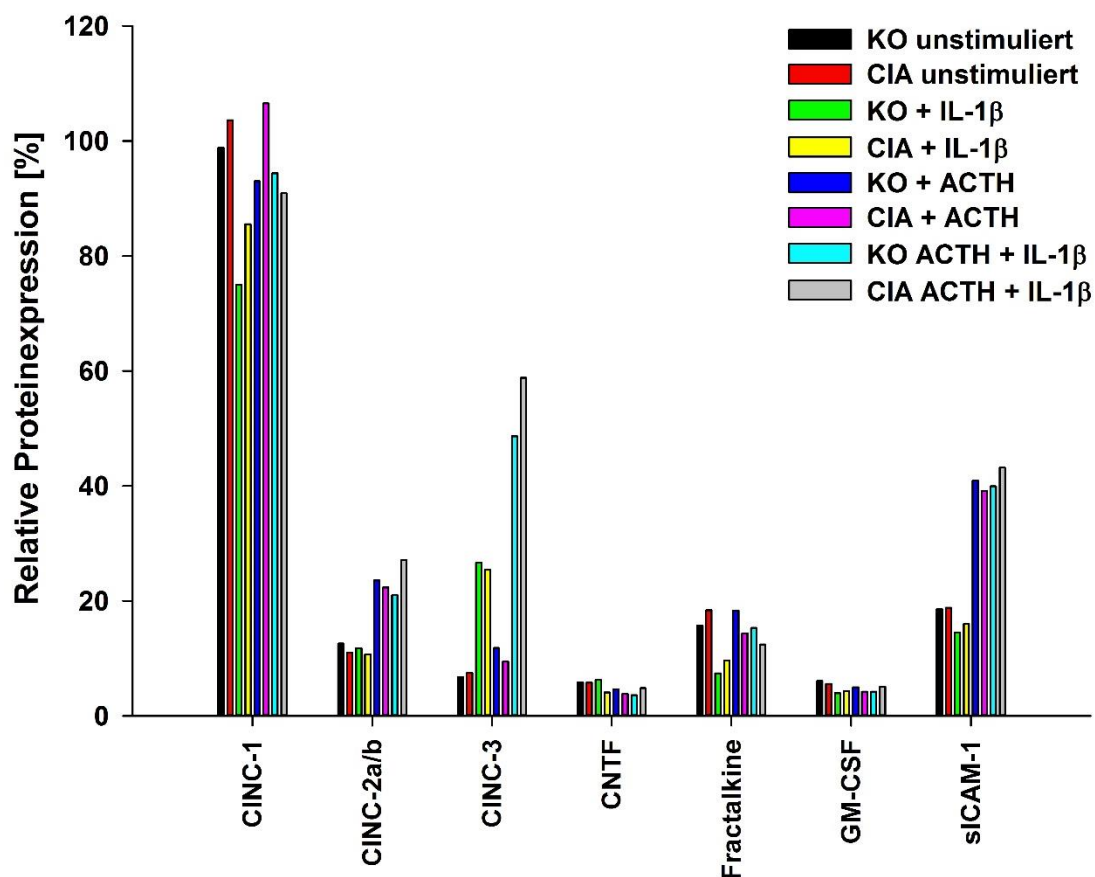


Abbildung 49: Zytokinprofil (I): Relative Expression der Zytokine CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1), CINC-2 α/β (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 α/β), CINC-3 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 3), CNTF (ciliary neurotrophic factor), Fractalkine, GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule 1) unter verschiedenen Bedingungen. Gemessen wurden die Überstände stimulierter Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA mittels Proteom Profiler. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Bei IFN- γ (Interferon gamma), IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3 und IL-4 (Interleukine) zeigten sich keine Unterschiede im allgemein relativ niedrigen Expressionsmuster unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen (Abbildung 50). Auffällig jedoch war, dass IL-1 β zumindest mit dieser Messmethode nicht mehr im Medium detektiert werden konnte, da man höhere Werte nach Zugabe von IL-1 β erwartet hätte (Abbildung 50).

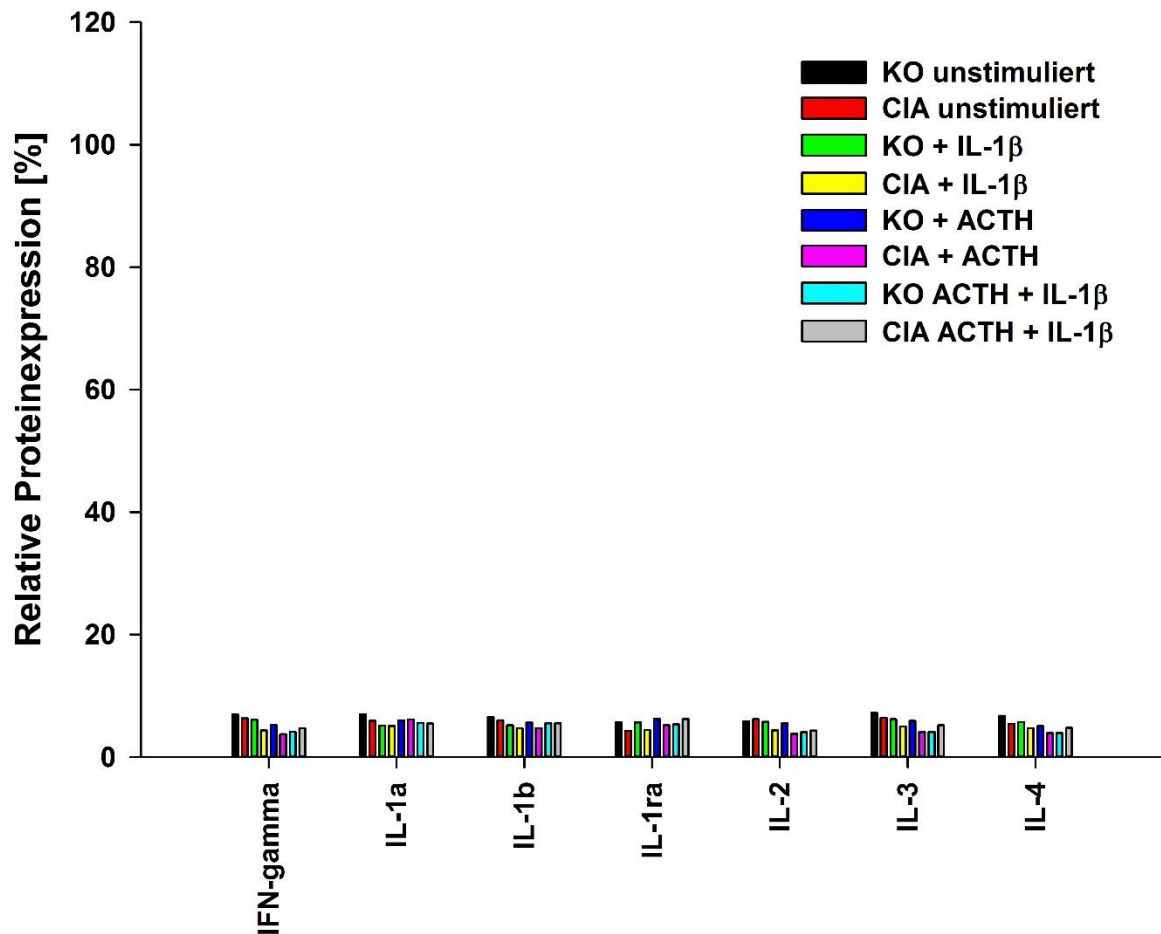


Abbildung 50: Zytokinprofil (II): Relative Expression der Zytokine IFN-gamma (Interferon gamma), IL-1a (Interleukin 1 alpha), IL-1b (Interleukin 1 beta), IL-1ra (Interleukin 1-Rezeptorantagonist), IL-2 (Interleukin 2), IL-3 (Interleukin 3) und IL-4 (Interleukin 4) unter verschiedenen Bedingungen. Gemessen wurden die Überstände stimulierter Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA mittels Proteom Profiler. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Proteine Thymus Chemokine, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) und VEGF (vascular endothelial growth factor) wurden vermehrt detektiert als MIG (monokine induced by gamma-Interferon), MIP-1a (macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP-3a (macrophage inflammatory protein 3 alpha), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted = CCL5) und TNF (Abbildung 51).

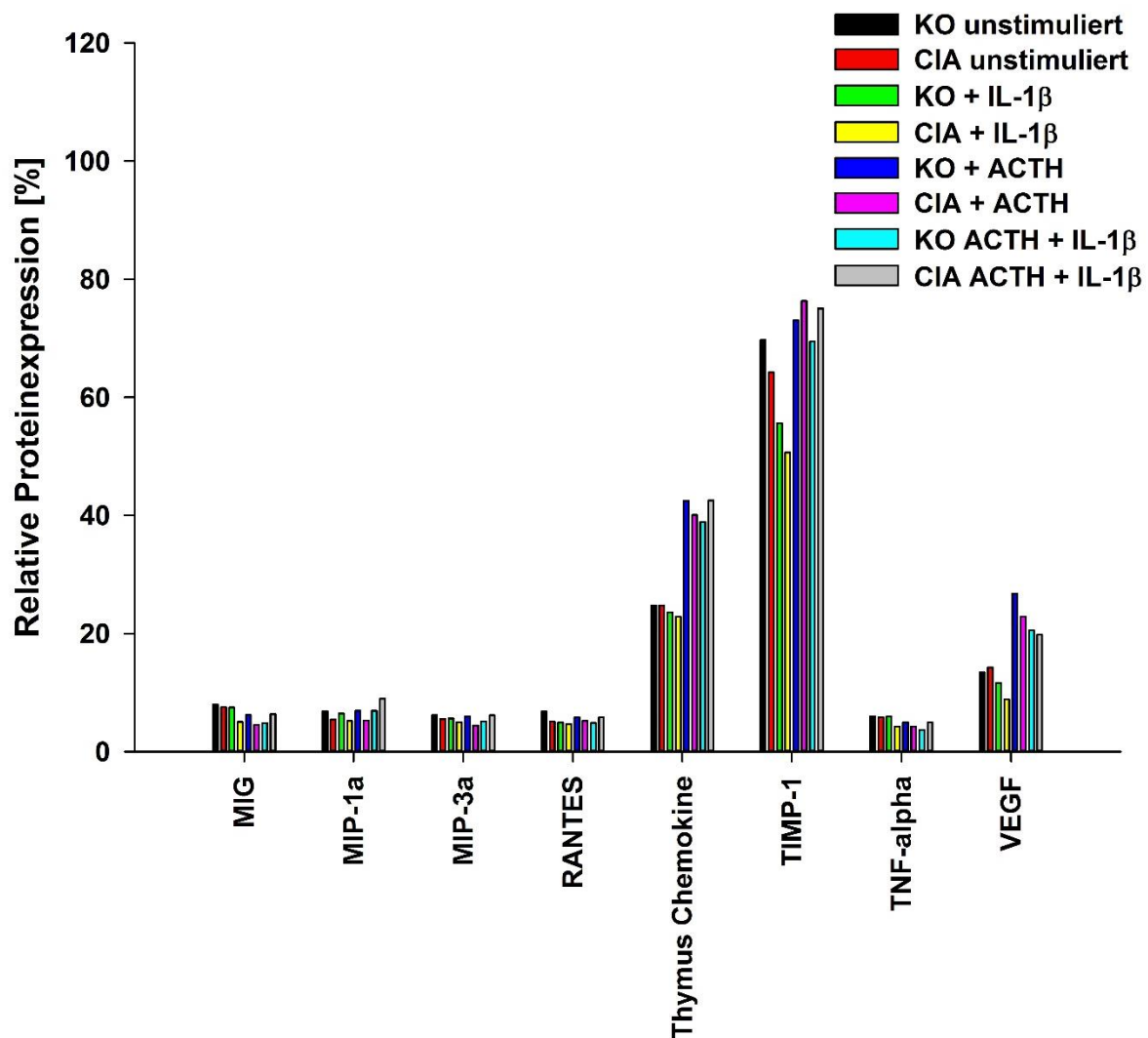


Abbildung 51: Zytokinprofil (III): Relative Expression der Zytokine MIG (monokine induced by gamma-Interferon), MIP-1a (macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP-3a (macrophage inflammatory protein 3 alpha), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted = CCL5), Thymus Chemokine, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1), TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) und VEGF (vascular endothelial growth factor) unter verschiedenen Bedingungen. Gemessen wurden die Überstände stimulierter Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA mittels Proteom Profiler. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

Die Proteine L-Selectin und weniger ausgeprägt auch LIX (C-X-C motif chemokine 5) waren in den untersuchten Proben vermehrt detektierbar. IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 (Interleukine) und IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) zeigten keine erhöhte Proteinexpression (Abbildung 52).

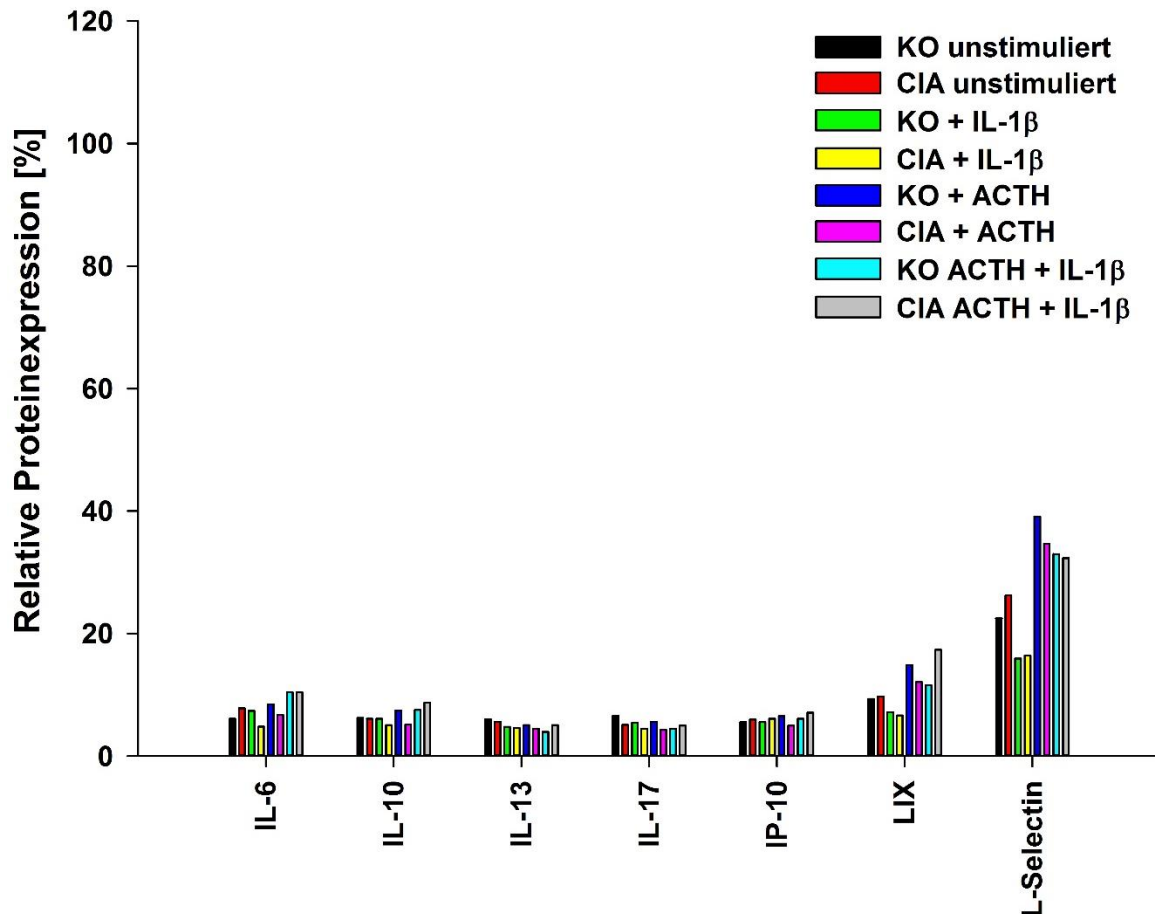


Abbildung 52: Zytokinprofil (IV): Relative Expression der Zytokine IL-6 (Interleukin 6), IL-10 (Interleukin 10), IL-13 (Interleukin 13), IL-17 (Interleukin 17), IP-10 (interferon gamma-induced protein 10), LIX (C-X-C motif chemokine 5) und L-Selectin unter verschiedenen Bedingungen. Gemessen wurden die Überstände stimulierter Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA mittels Proteom Profiler. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

3.8 Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder

An den ersten drei untersuchten Tagen (Tag 1, 5 und 28) zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Verhältnissen aus sER und Zytoplasmafläche der jeweiligen Tage (Abbildung 53): An Tag 1 und Tag 5 war jeweils die Ratio der Kontrolltiere signifikant höher als die der immunisierten Tiere. Dieses Verhältnis kehrte sich an Tag 28 um: Hier waren die Werte der arthritischen Tiere signifikant erhöht (Abbildung 53). Bei den Untersuchungen der Proben von Tag 55 war statistisch kein Unterschied festzustellen. Betrachtete man die Daten im Verlauf, so fiel auf, dass von Tag 1 nach Tag 5 beide Gruppen tendenziell eher einen Anstieg verzeichneten und diese Erhöhung von den CIA-Tieren beibehalten wurde, während die Werte der Kontrolltiere in der Tendenz an Tag 28 isoliert wieder etwas abnahmen (Abbildung 53).

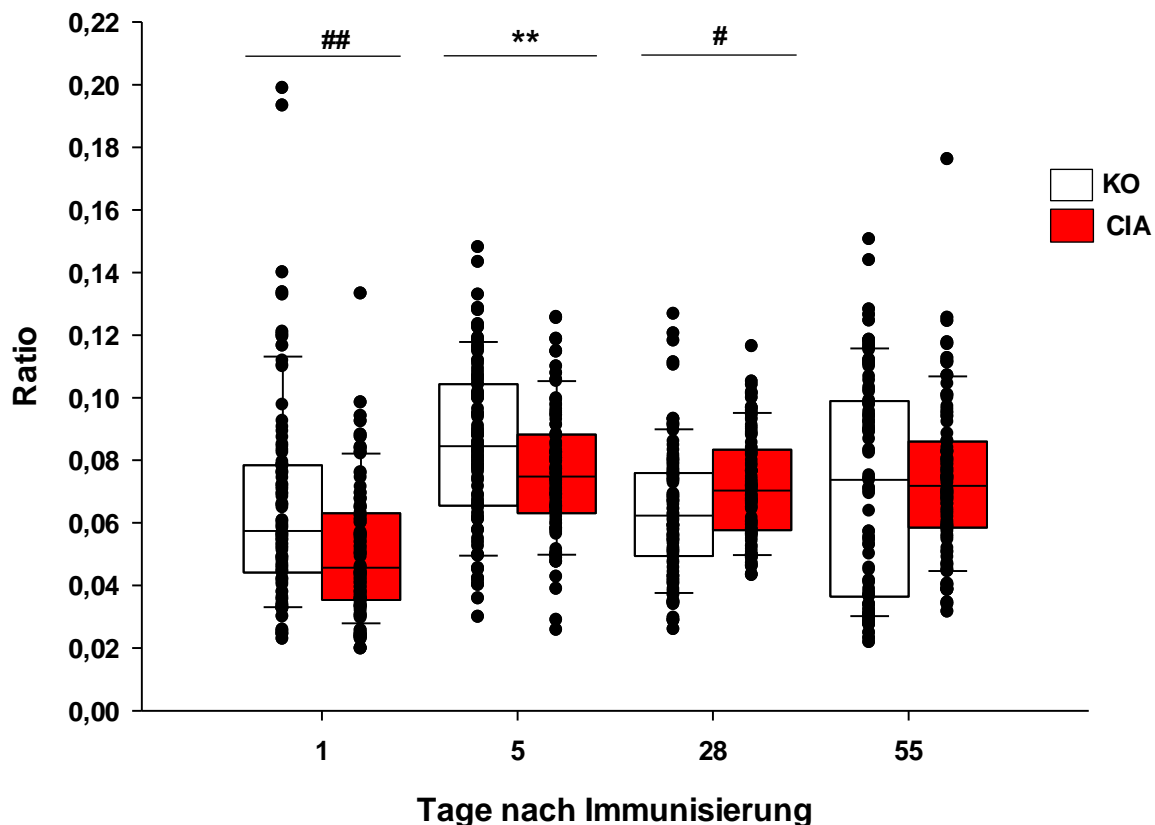


Abbildung 53: Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder: Ratio sER/Zytoplasma. Ein Punkt stellt den Wert der Ratio sER-Fläche/Zytoplasmafläche eines untersuchten elektronenmikroskopischen Schnittbildes im Bereich der Nebennierenrinde (Z. fasciculata) dar. n=96 pro Box. Die Box wird durch das 25ste und 75ste Perzentil begrenzt, in ihr befindet sich der Median (50stes Perzentil). Die unteren und oberen Begrenzungen entsprechen den 10ten und 90sten Perzentilen. Statistische Analyse: ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,005$; ## = $p < 0,001$; jeweils im direkten Vergleich zwischen CIA und KO je Versuchstag. Abkürzungen: KO = Kontrolltiere, CIA = Tiere mit Kollagen II-induzierter Arthritis

4 Diskussion

4.1 Score und Gewichtsverlauf

Die arthritischen Tiere entwickelten nach ca. 14 Tagen aufgrund der Immunisierung mit bovinem Kollagen II in inkomplettem Freund Adjuvans wie erwartet rheumatoide Symptome mit anschließender chronischer Phase (119) (Abbildung 11). Die konzertierte Aktion des Immunsystems, welche zur Entzündung führt, benötigt eine gewisse Vorlaufzeit, die wie bei ähnlichen Experimenten auch hier im Arthritisscore zu sehen war (113). Nach Abflauen der floriden Inflammationsphase blieben Gelenkdestruktion, -lockerung und –ankylose bestehen. Um Tag 5 zeigte sich bereits eine zunehmende Gewichtsdivergenz zwischen den Kontrolltieren und den arthritischen Tieren (Abbildung 12). Nach ähnlichem Ausgangsgewicht verloren die CIA-Tiere Gewicht. Es könnte sein, dass zirkulierende Zytokine wie z.B. IL-1 β und weitere Zytokine über das Hungerzentrum im Hypothalamus den Appetit mindern (120) (121). Ebenfalls konnte an Tierexperimenten gezeigt werden, dass TNF die intestinale Aminosäure- und Fructoseaufnahme über Hemmung der mukosalen Transportsysteme inhibiert (122). Ein evtl. erschwelter Zugang zum Futter wurde durch gut zugängliches Positionieren des Futters im Käfig weitgehend ausgeschlossen. Des Weiteren verlieren die Tiere an Muskelmasse wegen vermehrter Inaktivität durch Schonung der Gelenke (123). Zusätzlich benötigt das Immunsystem einen höheren Energieanteil um die aktivierten Immunzellen ausreichend mit Energie zu versorgen und geht so verstärkt die Energiereserven des Körpers an (124). Ein aktiviertes humanes Immunsystem kann z.B. bis zu einem Fünftel des Tagesenergiebedarfs bei moderater körperlicher Arbeit verbrauchen (124). Zusätzlich werden durch Stresshormone wie Katecholamine Glucose und Fette zum Verbrauch zur Verfügung gestellt (124). Dafür spricht auch, dass hier im Versuch nach Überschreiten des Entzündungshöhepunkts nach Tag 28 die Gewichtszunahme deutlich war, jedoch das Gewicht der Kontrolltiere während des restlichen Versuchszeitraums nicht wieder erreicht wurde (Abbildung 12).

4.2 Verhältnis des Nebennierengewichts zum Körpergewicht

Das Verhältnis aus Nebennierengewichten zu Körpergewichten war zu jedem Zeitpunkt bei den CIA-Tieren höher als bei den Kontrolltieren (Abbildung 14). Vor Manifestation der Arthritis waren die absoluten Nebennierengewichte der CIA-Tiere nur an Tag 1 nach Immunisierung signifikant schwerer, jedoch an Tag 5 und 14 in etwa gleich schwer wie die Nebennieren der Kontrolltiere (Abbildung 13). Jedoch war für Tag 5 und 14 die ausschlaggebende Komponente zur erhöhten Ratio das niedrigere Körpergewicht der jeweiligen CIA-Tiere. Eine ähnliche Untersuchung von Persellin et al. an Holtzman-Ratten unter adjuvant-induzierter Arthritis zeigte ebenfalls eine erhöhte Ratio aus Nebennierengewicht zu Körpergewicht der immunisierten Tiere (112). Bei den arthritischen Tieren nahm dort das relative Nebennierengewicht parallel mit der Arthritsentwicklung zu. Das Maximum wurde auch am Zeitpunkt mit der höchsten Entzündungsaktivität beschrieben (112) (im vorliegenden Versuch an Tag 28, vgl. Abbildung 11 und Abbildung 14). Die erhöhte Ratio kam dort sowohl durch vermindertes Körpergewicht, als auch durch höheres absolutes Nebennierengewicht zustande. Des Weiteren führten Persellin et al. eine histologische Analyse der Nebennieren durch, wobei sich als Ursache für die Gewichtszunahme der Nebenniere eine zelluläre Hypertrophie und nicht etwa eine vermehrte Fetteinlagerung fand (112). Eine Volumenzunahme der Nebennierenzellen unter ACTH-Einwirkung wurde auch bei einer stereologischen Untersuchung von Andreis et al. postuliert (125). Einige Organellen hatten ihr Expansionsmaximum schon am dritten Tag nach ACTH-Einwirkung ausgereizt, was die signifikant höheren Ratios bei CIA-Tieren gegenüber Kontrolltieren an den Tagen 1 und 5 nach Immunisierung des vorliegenden Experiments teilweise erklären könnte (125) (Abbildung 14). Mäusen, denen eine ethanolische Trinitrobenzen-Sulfonsäurelösung rektal appliziert wurde, um eine Morbus Crohn ähnliche chronisch-inflammatorische Erkrankung zu induzieren, zeigten durch Stimulation der Nebenniere bereits am dritten Tag nach Krankheitsinduktion ebenfalls Hyperplasie und Hypervaskularisation des Kortex (126). Elektronenmikroskopisch war das Zellvolumen der Nebennierenrindenzellen der erkrankten Tiere gegenüber den Kontrolltieren erhöht (126). Setzte man einen Anti-IL-6-Antikörper sechs Stunden vor Colitisinduktion ein, so bewirkte dieser keine Beeinträchtigung der Colitisentwicklung, wohl aber eine teilweise Normalisierung der Hyperplasie und Hypervaskularisation der Nebenniere (126). Daraus könnte man

folgern, dass nicht nur ACTH, sondern auch die zirkulierenden Zytokine, wie z.B. IL-1 β , IL-6, TNF, selbst in der subklinischen Phase der Arthritis, bereits Einfluss auf den Aktivitätsstatus und die Morphologie der Nebennieren nehmen. Die absoluten Gewichte der Nebennieren der CIA-Tiere zeigten an Tag 1 und an Tag 28, der Hochphase der akuten Entzündung, ihren Maximalwert (Abbildung 13). Geht man davon aus, dass an Tag 28 der Tierorganismus mittels einer aktivierten HPA-Achse versucht der Entzündung entgegenzuwirken, müsste sich dies auch in hohen ACTH-Werten widerspiegeln.

Langfristige (8 Tage) ACTH-Stimulation der Nebenniere der Ratten bewirkt eine Zellhypertrophie in den in einer Studie untersuchten Zellen der *Zona glomerulosa* (127). Diese Hypertrophie kommt v.a. durch eine Megalie der Mitochondrien und des sER zustande (127). Diesem Argument wird durch eine Untersuchung von Nussdorfer et al. insofern Gewicht verliehen, dass bei Nebennierenzellen der Ratte nach Prednisolongabe, und somit Unterdrückung der endogenen Steroidbiosynthese, alleine der Rückgang des sER für ca. 60% der Minderung des Zellvolumens und des Nebennierengewichts verantwortlich ist (128). Das relativ hohe Gewicht der Nebennieren der CIA-Tiere an Tag 1 (Abbildung 13) kann man sich also nicht durch eine zelluläre Hypertrophie, ausgelöst durch eine langfristig erhöhte ACTH-Einwirkung, erklären.

Eine elektronenmikroskopische Studie von Mazzocchi et al. zeigte, dass kurzzeitige ACTH-Einwirkung für 60 Minuten die Zellen der Nebenniere zwar stimuliert, aber ultrastrukturell nur eine Volumenminderung der Lipidspeichervesikel für die Cholesterolfreisetzung zur Steroidbiosynthese zu beobachten ist (127).

Die Hypothese einer etwaigen starken Einwanderung von Immunzellen in die Nebenniere bei Arthritis gilt es noch im Detail zu beweisen, auch wenn prinzipiell die Existenz von dendritischen Zellen und Makrophagen in der Nebenniere und eine Migration solcher Zellen in die Nebenniere bereits gezeigt wurde (129) (130) (131). Interessanterweise wurden bei anderen endokrinen Organen wie der Hypophyse oder der Schilddrüse ähnliche Phänomene einer Invasion derartiger Zellen festgestellt, allerdings ebenfalls nicht im Rahmen einer Arthritis (132) (133). Die weiter oben zitierte Studie an Mäusen mit induziertem Morbus Crohn zeigte zwar eine Einwanderung von CD45⁺ Zellen (Pan-Leukozytenmarker) in die Nebennieren, doch diese Einwanderung

war in gleichem Maße bei Kontrolltieren und kranken Tieren zu beobachten (126). Da die Nebennieren im vorliegenden Experiment sofort nach Explantation gewogen wurden, könnte es sein, dass an Tag 1 aufgrund des Stresses durch die Narkose und Immunisierung eine Hyperperfusion der Nebennieren der CIA-Tiere die Gewichtswerte passager angehoben hat.

4.3 Plasmacorticosteronkonzentration

Die mittels ELISA gemessenen Corticosteronkonzentrationen aus linksventrikulärem Blutplasma zeigten im kompletten Zeitverlauf des Experiments keine signifikanten Unterschiede zwischen CIA- und Kontrolltieren bezogen auf das Nebennierengewicht (Abbildung 15). Die gemessenen Plasmacorticosteronkonzentrationen lagen laut der Produktinformation des verwendeten Corticosteron-ELISAs im zu erwartenden Bereich für weibliche Ratten. Trotz klinisch hochmanifester Gelenkentzündungen konnte die Nebenniere bzw. die HPA-Achse die Corticosteronkonzentration im Plasma nicht derart erhöhen, um damit der Entzündung entgegenzuwirken. Dies geht konform mit einer Beobachtung von del Rey et al., wobei durch exakt dieselbe Art der Arthritisinduktion bei der gleichen Rattengattung, nur an Tag 5 nach Immunisierung erhöhte Corticosteronwerte detektiert wurden (134). Mit weiterem Fortschreiten der Erkrankung nahmen die Plasmacorticosteronwerte ab und waren gegen Ende des Versuchs (Tag 55 Post-Immunisierung) sogar niedriger als die Spiegel der gesunden Kontrolltiere (134). Diese Entdeckungen stützen die These einer relativen Nebenniereninsuffizienz, bei der es der Nebenniere nicht möglich ist, adäquate Glukokortikoidspiegel im Verhältnis zum Entzündungsgrad aufzubauen, um den Autoimmunprozess zu unterdrücken. Bei RA-Patienten wurde des Öfteren beobachtet, dass trotz erhöhten TNF-, IL-1- und IL-6-Werten die Kortisolspiegel auf normalen Niveaus rangierten (105). Ein normales HPA-Feedback würde jedoch verlangen, dass die Kortisolproduktion auf die erhöhten proinflammatorischen Mediatoren hin ansteigt (105) (135). So zeigten gesunde Personen, denen IL-6 in Dosen appliziert wurde, die den Blutplasmawerten von RA-Patienten entsprachen, eine adäquate ACTH- und Kortisolantwort auf diesen Stimulus (136). RA-Patienten zeigten eine deutlich geringere Kortisol-/IL-6 Ratio als die gesunden Studienteilnehmer. Dieses Phänomen wurde in dieser Publikation als disproportionierte bzw. unverhältnismäßig niedrige Kortisolsekretion bezeichnet (136). Das untersuchte Blut in der vorliegenden Arbeit wurde am Nachmittag abgenommen. Die mittleren

Plasmacorticosteronkonzentrationen sind bei gesunden Tieren dort am höchsten. Bei arthritischen Tieren wurde aber von Persellin et al. eine Verschiebung der zirkadianen Rhythmik festgestellt, wodurch die höchste Corticosteronsekretionsrate 6h früher eintritt (112). Möglicherweise wurde durch dieses Phänomen der Sekretionshöhepunkt verpasst und der direkte Vergleich zwischen gesunden und arthritischen Tieren verfehlt. Vorstellbar wäre in diesem Tierversuch auch das Vorliegen einer permissiven Nebenniereninsuffizienz, da der Tierorganismus nicht zwischen Autoimmunentzündung und Infektion unterscheidet und deshalb zunächst das Immunsystem und damit den Entzündungsprozess auf hohem Level hält ohne es zu supprimieren, um einer möglichen Infektion adäquat zu begegnen.

Hier zeigt der Tierversuch seine Grenze, denn er simuliert nicht den chronischen Aspekt einer jahrelang dauernden rheumatischen Krankheit mit ihren Schüben sondern bestenfalls einen ersten Schub. Rezidivierende Schübe sind in diesem Versuchsaufbau nicht reproduzierbar. Dass die akute Entzündung, trotz relativ normaler Corticosteronspiegel, nach ungefähr vier Wochen abgeklungen ist, könnte damit erklärt werden, dass Substratmangel herrscht: Die gegen bestimmte Autoantigene gerichtete Aktivität der Immunzellen hat nach einer bestimmten Zeit die begrenzt vorliegende und nicht regenerative Knorpelmatrix zerstört und hinterlässt sichtbare Gelenkdestruktionen. Mangels weiterer Stimulation des Immunsystems lässt die Entzündungsaktivität nach. Die Entzündung brennt aus, da der Knorpel als Autoantigen verschwindet.

Des Weiteren lässt ein alleiniger Hormonwert (Corticosteron im Blutplasma) des Organismus keine Rückschlüsse zu auf die tatsächliche Wirkung an der Zielzelle, welche durch Rezeptorsensibilisierungen, -polymorphismen und -regulation gänzlich anders reagieren kann als eine gesunde Zielzelle. Der Corticosteronspiegel ist in bester Näherung lediglich ein Surrogatparameter für die Stressantwort und Aktivierung der HPA-Achse.

4.4 Corticosteron-Sekretion am explantierten Organ

Am fünften Tag nach Immunisierung scheint das zugegebene Zytokin IL-1 β eine Sekretionssteigerung von Corticosteron unabhängig von der ACTH-Zugabe bei den Nebennieren der CIA-Tiere zu bewirken (Abbildung 16). Am nächsten Messzeitpunkt an Tag 28 hat weder ACTH noch IL-1 β einen Einfluss auf die Corticosteronproduktion der Nebennieren *in vitro* (Abbildung 17). An Tag 55 nach Immunisierung scheint sich die Wirkung von IL-1 β auf die Corticosteronsekretion der Nebennieren der CIA-Tiere verglichen mit Tag 5 ins Gegenteil zu verkehren, wobei auch die unstimulierten und ACTH-stimulierten Nebennieren verminderte Corticosteronsekretionsraten verzeichneten (Abbildung 18).

Diese Ergebnisse spiegeln widersprüchliche Forschungsergebnisse wider, die von einer Inhibition der Corticosteroidsynthese bis zu einer Stimulation der Corticosteroidsynthese durch IL-1 β reichen. Einige Experimente an Nebennieren suggerieren einen direkten Einfluss von Zytokinen, wie IL-1 β , auf die Glukokortikoidsynthese, andere kommen zu dem Schluss, dass Interleukine alleine keine Beeinflussung dieses Systems vollbringen. Letztendlich ist der Einfluss von IL-1 β auf die Steroidogenese nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass IL-1 β die Corticosteronsynthese direkt anregt, andererseits kann IL-1 β auch Schritte der Steroidogenese hemmen:

Zunächst scheint IL-1 β ein potenter Aktivator der HPA-Achse zu sein und stimuliert die ACTH- und Kortisolfreisetzung, welches aber z.B. durch COX-Inhibitoren abgeschwächt werden kann (137). IL-1 β scheint an Tag 5 des vorliegenden Versuchs die Corticosteron-Sekretion zu erhöhen (Abbildung 16). Allerdings geht kein erhöhter Sauerstoffverbrauch damit einher (Abbildung 41).

An isolierten Leydig-Zellen der Ratte zeigte alleinige IL-1 β -Inkubation zunächst einen stimulatorischen Effekt auf die Androgen-Produktion (138). Auf Leydig-Zellen, welche 6 Tage in Medium gehalten wurden und wobei eine LH-Inkubation (luteinisierendes Hormon) erfolgte, welches die Steroidogenese *per se* stark anregt, zeigte sich hingegen ein inhibitorischer Effekt von IL-1 β auf die Androgensekretion (138). Es gab hierbei Hinweise darauf, dass IL-1 β frühe Enzymschritte der Androgensynthese förderte und späte Syntheseschritte inhibierte (138). Hierbei ist zu beachten, dass bei der Androgensynthese das Enzym 17,20-Lyase Kohlenstoffatome aus dem

Molekülgerüst entfernt (Deacetylierung) und dieser Schritt bei der Kortisolsynthese nicht erfolgt, weswegen die Effekte von IL-1 β auf die Androgensynthese nicht direkt auf die Kortisolsynthese übertragbar sind.

IL-1 β kann die neuroendokrinen CRH-Neurone im zentralen Nervensystem stimulieren (139). Grundlage für die Reaktion der HPA-Achse auf IL-1 β scheint der Hypothalamus und die Hypophyse zu sein, da hypophysectomierte Tiere keine ACTH- und Corticosteronantwort auf IL-1 (Subtyp nicht näher spezifiziert) geben können (137). So blockieren auch neutralisierende CRF-Antikörper die durch IL-1 (Subtyp nicht näher spezifiziert) ausgelöste ACTH-Erhöhung und CRF-Knockoutmäuse zeigen eine um 90% verminderte Reaktionsfähigkeit auf IL-1 β (137). Es gibt Beweise für das Vorliegen eines intraadrenalen CRH-/ACTH-Systems, welches durch IL-1 β stimuliert werden kann (140). Inhibitoren von CRH und ACTH können die stimulierende Wirkung von IL-1 β auf dieses System hemmen. Ebenso scheint für die Wirkung von IL-1 β die Anwesenheit von chromaffinen Zellen in der Medulla der Nebenniere nötig zu sein (140).

Laut Gonzalez-Hernandez et al. ist IL-1 β der größte Glukokortikoid-induzierende Faktor im Zusammenspiel des Immunsystems mit der HPA-Achse (141). Dieses Phänomen kann man im vorliegenden Experiment in der frühen Phase der Kollagen II-induzierten Arthritis (Tag 5, Abbildung 16) beobachten. Tominaga et al. zeigten, dass Nebennierenzellen der Ratte (ohne Arthritis) in Kultur durch alleinige IL-1 β -Zugabe zur Glukokortikoidproduktion angeregt werden konnten. Dazu war eine Inkubationszeit von mindestens 12h nötig, um einen direkten Effekt des Interleukins auf die Nebennierenzellen zu erkennen (142). Diese Inkubationszeit wurde in vorliegender Arbeit durchgehend erreicht.

Ein weiterer peripherer Mechanismus könnten Makrophagen sein, die in Nebennieren zu finden sind. Diese befinden sich v.a. in der *Zona reticularis*, aber auch in der *Zona fasciculata* (143) (144). Damit sind sie relativ zentral in der Nebenniere und können vermutlich alle Schichten mit ihren Sekretionsprodukten beeinflussen. Sie können IL-1, IL-6 und TNF sezernieren, womit sie womöglich Einfluss über einen Immuno-adrenalen Crosstalk auf die steroidproduzierenden Nebennierenzellen nehmen (143). Bei einer Publikation von Whitcomb et al. wurden Monozyten aus peripherem Blut des Menschen in Kokultur mit humanen adrenalen Zellen von nephrektomierten

Nierentumorpatienten gegeben. Diese Monozyten konnten die Glukokortikoidsynthese CRH- und ACTH-unabhängig stimulieren. Zwar geschah dies in einem geringeren Ausmaß als über den klassischen HPA-Weg, doch der Autor folgerte daraus, dass dieser Weg eine signifikante Rolle während Infektion oder Stress spielen könnte (145). So konnte IL-1-Zugabe ohne Monozyten die Glukokortikoid-Sekretion um 30% anheben, wie dies auch an Tag 5 des vorliegenden Experiments zu sein scheint (Abbildung 16). Steigende IL-1-Konzentrationen bewirkten jedoch nach Erreichen eines Kortikoidpeaks, einen Abfall auf nahezu das Ausgangsniveau der Glukokortikoidsynthese ohne Stimulation (145). Durch diese Beobachtung wurde vermutet, dass IL-1 einen gewissen Teil zur Monozyten-induzierten Glukokortikoidproduktion beiträgt (145).

Untersuchungen, die konträr zu o.g. Schilderungen zeigen, dass IL-1 β keine Corticosteronmehrsynthese verursacht, sind in der Literatur durchaus zu finden: Dazu muss erwähnt werden, dass es kaum Untersuchungen unter den Bedingungen bei experimenteller Arthritis zu diesem Thema gibt. Eine Untersuchung hierzu zeigte jedoch einen hemmenden Effekt von IL-1 β auf die ACTH-induzierte Corticosteronmehrausschüttung bei DA-Ratten unter experimenteller Arthritis, während die basale Sekretionsrate von Corticosteron unbeeinflusst blieb (113). Gleiches Phänomen wurde bei fetalen humanen Nebennieren entdeckt, wo durch Inkubation mit IL-1 β eine durch ACTH vermittelte Kortisolausschüttung partiell inhibiert wurde (146). IL-1 β kann somit die ACTH-induzierte Mehrproduktion von Corticosteron im Tierexperiment teilweise unterdrücken (113). Analog hierzu zeigten Nebennierenviertel, die mit IL-1 oder ACTH von Gwosdow et al. inkubiert wurden lediglich ein Ansprechen auf ACTH, nicht jedoch auf das Zytokin (147). Der Autor schloss daraus, dass IL-1 die Nebenniere nicht direkt stimulieren kann. Er schloss aber nicht aus, dass eine konzertierte Aktion von IL-1 mit anderen Hormonen oder weiteren peripheren Mechanismen eine direkte Einflussnahme auf die adrenale Glukokortikoidproduktion nehmen könnte (147).

Auch bei Leydig-Zellen der SD-Ratte in Kultur, welche für die Testosteronsynthese verantwortlich sind, führte eine 24 stündige Inkubation der Zellen mit IL-1 β zu einer deutlich verminderten, durch hCG ausgelösten, Testosteronausschüttung. Angriffspunkt von IL-1 β war hier P450scc (Side chain cleavage Enzym), welches Cholesterol zu Pregnenolon umwandelt. IL-1 β reduzierte die durch hCG induzierte

P450scc-mRNA-Synthese um 45% (148). Dieses Enzym wird auch bei der Corticosteronsynthese benötigt und könnte durch IL-1 β in adrenokortikalen Zellen auch vermindert exprimiert werden. Interessant ist auch die Hemmung auf mRNA-Ebene und nicht auf Enzymebene. So wird auch die folgende ATP-konsumierende Translation gemindert und sollte so mit vermindertem Sauerstoffverbrauch einhergehen. Ebenso kann das Protein StAR durch IL-1 β in Leydig-Zellen gehemmt werden (149). Dieses Protein ist für den Transport des Cholesterols von der äußeren an die innere Mitochondrienmembran zuständig (149).

An Tag 55 zeigten die Nebennieren aller CIA-Tiere unabhängig von einer Stimulation eine verminderte Corticosteron-Sekretion (Abbildung 18). Die Nebennieren der arthritischen Tiere scheinen im Zeitverlauf hinsichtlich einer ausreichenden Corticosteron-Produktion insuffizient zu werden. Die Beobachtung, dass steigende IL-1-Konzentrationen nach anfänglicher Stimulation ein Abfallen der Glukokortikoidsynthese bewirken, zeigt, dass auch in dem vorliegenden Experiment dosis- oder zeitabhängige Effekte des IL-1 β möglich wären. Konzentrationen, die unter physiologischen Bedingungen stimulierend wirken, könnten sich unter pathologischen Bedingungen (z.B. Kollagen II-induzierte Arthritis) z.B. durch Sensibilitätsänderungen der Zielzelle ins Gegenteil verkehren.

Für IL-1 α wurde ein solcher Effekt bereits beschrieben: Mittlere Konzentrationen (100-300U/ml) konnten die Corticosteronproduktion von Nebennierenzellen von Wistar-Ratten in Kultur deutlich steigern, während hohe Konzentrationen (1.000U/ml) die Corticosteronproduktion der Zellen auf das Niveau unstimulierter Kontrollzellen abfallen ließ (142). IL-1 α und IL-1 β werden zwar von zwei unterschiedlichen Genen kodiert, weisen aber in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz starke Homologien auf (150). Ebenso binden beide Zytokine an dieselben beiden Rezeptoren IL-1R1 und IL-1R2 (151). Während IL-1R2 nur die Bioverfügbarkeit der Interleukine reguliert und keine Signaltransduktion in die Zelle vermittelt, leitet IL-1R1, mit unterschiedlicher Affinität, die Signale von IL-1 α und IL-1 β in die Zelle fort (150).

Es ist daher denkbar, dass IL-1 β ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Corticosteroidproduktion ausübt. Die nicht mehr durch IL-1 β stimulierbare Corticosteronsekretion an Tag 55 könnte Ausdruck eines solchen dosis-/zeitabhängigen Effekts sein. Nachdem 55 Tage lang die durch Arthritis induzierten

Zytokine im Blut auch auf die Nebennieren einwirkten, könnte dort eine Rezeptordesensibilisierung stattgefunden haben. Die Zellen der Nebennieren hätten dadurch nicht mehr auf das zugegebene IL-1 β mit adäquater Sekretionssteigerung reagieren können (Abbildung 18 und Abbildung 20).

Im vorliegenden Experiment wurde 1ng/ml IL-1 β verwendet. Diese Konzentration ist deutlich über physiologischen Werten. Die physiologische IL-1 β Konzentration im Plasma gesunder DA-Ratten liegt ungefähr bei $14,4 \pm 2,2$ pg/ml und steigt selbst nach Immunisierung der Tiere auf höchstens ungefähr einen Median von 250% davon an (152). Das zeigt, dass die Nebennieren der CIA-Tiere selbst gegenüber solch hohen Konzentrationen an IL-1 β resistent werden.

Man benötigt generell - wie im vorliegenden Experiment in Form von Nebennierenachteln - intaktes Gewebe, um IL-1 β -Effekte zu erkennen. Dies zeigte eine Arbeit von Harlin et al., bei der humane fetale Nebennieren in Organkultur gebracht und mit ACTH und/oder IL-1 β inkubiert wurden. ACTH erhöhte die Kortisolproduktion um das zehnfache, während IL-1 β alleine die Kortisolproduktion nicht erhöhen konnte (146). Die Zugabe von IL-1 β auf ACTH-inkubiertes Gewebe bremste den Kortisolanstieg, den ACTH alleine vermittelte, ab. Das gleiche Experiment wurde dann nochmals mit vereinzelter Zellen *in vitro* durchgeführt, zeigte hier jedoch keinen inhibierenden Effekt von IL-1 β auf die durch ACTH hervorgerufene Hormonmehrproduktion mehr (146).

Möglich für die verminderte Detektion von Corticosteron an Tag 55 bei CIA-Tieren wäre allerdings auch ein Abbau des Corticosterons hin zu biologisch inaktivem und mit dem hier verwendeten, für Corticosteron spezifischen, ELISA nicht detektierbarem 11-Dehydrocorticosteron durch die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 β -HSD 2). Die Expression von 11 β -HSD 2 in synovialen Makrophagen zeigte bereits eine positive Korrelation mit dem Grad der Entzündung im Synovialgewebe bei RA-Patienten (153). Der Autor folgerte, dass die Expression von 11 β -HSD 2 ein Parameter für die Entzündung im Synovialgewebe sein könnte (153). Durch Genexpressionsanalysen wurde herausgefunden, dass bei Patienten mit früher RA die peripheren Blutmonozyten eine mehr als dreifache Erhöhung der 11 β -HSD 2 zeigen (154). Das der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Experiment behandelt auch eine frühe erste Autoimmunreaktion gegen Knorpelbestandteile, wobei ähnlich der

Expressionssteigerung beim Menschen auch bei den DA-Ratten vermehrt 11 β -HSD 2 positive Blutmonozyten in die Nebenniere eingewandert sein könnten. Bei normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) zeigte IL-1 β -Inkubation eine Zunahme von 11 β -HSD 1, welches biologisch weitgehend inaktives Kortison in aktives Kortisol umwandelt (155). Hier müsste sich dann eine Zunahme von Corticosteron im Medium zeigen (156), wie in vorliegender Arbeit an Tag 5 (Abbildung 16). Diese Zunahme von 11 β -HSD 1 durch IL-1 β und TNF konnte auch eine Arbeit von Cooper et al. bestätigen (157): Hier wurden an humanen Osterosarkomzellen (MG-63) und an humanen Osteoblasten *in vitro* nach IL-1 β - und TNF-Inkubation eine Inhibition des 11 β -HSD 2-Enzyms und gleichzeitig eine Erhöhung der mRNA und der Enzymaktivität von 11 β -HSD 1 festgestellt (157). Ein solcher Effekt könnte für die erhöhte Detektion von Corticosteron an Tag 5 des Experiments mit verantwortlich sein. Beide genannten Phänomene vermittelt durch 11 β -HSD 1 / 11 β -HSD 2 kann man so in vorliegendem Experiment nicht beweisen, da die beiden Enzymisoformen nicht gemessen wurden. Es könnte jedoch theoretisch eine Expressionszunahme von 11 β -HSD-2 von Tag 5 über Tag 28 bis Tag 55 plausibel für die Abnahme der Corticosteronsekretion verantwortlich zeichnen.

Warum selbst die Kontrolltiere generell keine Erhöhung der Corticosteronsekretion auf den ACTH-Stimulus zeigen, könnte ebenfalls daran liegen, dass ACTH zu kurz eingewirkt hat, nicht an die Zielzelle diffundieren konnte, durch unspezifische Proteasen abgebaut wurde oder zu niedrig konzentriert war, um alle steroidproduzierenden Zellen des Gewebeverbunds zu stimulieren (Abbildung 19). Auch eine Interferenz mit dem Sauerstoffsensor am Boden der Inkubationskammerchen scheint eine mögliche Erklärung zu sein, da Stimulationsexperimente von Nebennierenkompartimenten mit ACTH in selbiger Konzentration bereits erfolgreich stattgefunden haben, jedoch noch nicht auf den speziellen Platten zur Sauerstoffmessung (113).

4.5 Proteom Profiler: CINC & Neutrophile

Da bei den Messungen der Überstände der Nebennieren mittels Proteom Profiler zunächst überraschend eine generell relativ hohe und teilweise durch die verschiedenen Stimulationsbedingungen veränderte Expression an CINC-1 und CINC-3 auffiel (Abbildung 49), wurden diese beiden Proteine daraufhin quantitativ mittels ELISA untersucht. Zusammenfassend kann man erkennen, dass CINC-1- und CINC-3-Proteine v.a. durch IL-1 β Einwirkung vermehrt exprimiert wurden (Abbildung 22 bis Abbildung 39). Dieser Effekt ist im Proteom Profiler bei CINC-3 auch schon zu erahnen (Abbildung 49). ACTH-Einwirkung scheint ebenso wie der Krankheitsstatus im ELISA keinen großen Einfluss auf die CINC-Expression zu haben, denn IL-1 β vermochte sowohl Nebennieren von CIA- als auch von Kontrolltieren zu vermehrter CINC-Sekretion anzuregen (Abbildung 29 und Abbildung 38).

CINC-Proteine gehören zu der Gruppe der Chemokine (chemotaktische Zytokine) und übernehmen Signal- und Chemotaxisfunktionen gegenüber Immunzellen (158) (159). Chemokine enthalten vier Cysteine und sind nach der Aminosäuresequenz um die ersten beiden Cysteine eingeteilt. Sie transduzieren ihre Signale über G-Proteingekoppelte Rezeptoren in die Zielzelle (160). CINC-1 und CINC-3 gehören zur CXC-Familie, bei denen die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure (X) voneinander getrennt sind (160). Zudem gehören die CINC-Proteine zur IL-8-Familie und sind potente chemotaktische Faktoren für Neutrophile *in vitro* und *in vivo* (158).

Es existieren zwei spezifische Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2), wobei die CINC-1 und die CINC-3 Proteine v.a. hochaffin an den CXCR2 binden, wodurch ein Kalziumeinstrom in die Zelle induziert wird (158) (161). CINC-1 und CINC-3 haben ähnliche Eigenschaften auf Neutrophile, wobei CINC-3 in höheren Konzentrationen die Eigenschaft Neutrophile anzulocken zunehmend verliert (161). CINC-1 und -3 vermitteln einen großen Anteil an der Invasion von Neutrophilen in Entzündungsmodellen bei Ratten wie der Glomerulonephritis, allergischen Inflammationen und LPS-induzierten Entzündungen (162).

Tierexperimente mit Antikörpern gegen CINC-Proteine zeigten, dass durch deren Blockade eine Suppression der Neutrophileninfiltration in das Entzündungsgebiet von ca. 60% zu erreichen war (162). Daraus schlossen die Autoren, dass nicht ausschließlich CINC-Proteine für die Neutrophilenmobilisation zuständig sind, sondern

auch noch andere chemotaktische Signalmoleküle wie z.B. C5a, welches ebenfalls nachgewiesen werden konnte (162).

Bei einem Tierversuch zeigten Takano et al., dass CINC-1 sein Expressionsmaximum bereits 4h nach LPS-Injektion in eine Gewebetasche erreicht, während CINC-3 kontinuierlich weiter anstieg (162). Rekombinantes CINC-3 der Ratte stimuliert die Migration von Neutrophilen, wobei kein Einfluss auf die Migration von Makrophagen beobachtet wird (163). Periphere Blutneutrophile benutzen die Integrine CD11a, CD11b und CD11c, um an das Endothel anzudocken, bevor die Extravasation erfolgt. CINC-3 kann die Expression von CD11b und CD11c triggern (164).

Auch im Mesenterium von Ratten konnte chemisch synthetisiertes CINC in einer Konzentration von 10^{-8} M eine Adhärenz von Neutrophilen an die postkapillären Venulen innerhalb von 15 Minuten auslösen. Ebenfalls dilatierten unter diesem CINC-Einfluss die Gefäße für eine folgende Extravasation (165).

In einem Autoimmunitätsmodell mit Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) zeigte die Applikation der GBM-Antikörper eine Expressionszunahme von CINC-3 mRNA. Ein Antikörper gegen CINC-3, der kurz vor Applikation der GBM-Antikörper injiziert wurde, zeigte einen 40 prozentigen Rückgang der infiltrierenden Neutrophilen und damit weniger glomeruläre Läsionen nach 24h. Da durch den CINC-3 Antikörper auch die CINC-3 mRNA-Expression reduziert wurde, schloss der Autor eine durch CINC-3 induzierte autokrine Selbststimulation zur CINC-3-Expression nicht aus (166).

Auch Zellen einer Zelllinie von Rattennieren (NRK-52E) konnten nach IL-1 β -Stimulation CINC-Proteine sezernieren (167)(168). Einen weiteren Beweis, dass IL-1 β die Expression von CINC-Proteinen erhöht, zeigte ein Experiment, bei dem IL-1 β in das Rückenmark von Ratten appliziert wurde: Eine erhebliche Steigerung von CINC-1- und CINC-3-Konzentrationen und daraufhin folgende Neutrophileninvasion konnte detektiert werden. Nach 24h nahm die CINC-1- und CINC-3-Expression wieder ab (159). Ein solches negatives Feedback, bei dem die Neutrophileninvasion eine folgende Herabregulierung der CINC-1- und CINC-3-Chemokine zeigt, wurde von Blackwell et al. publiziert (169).

Die vermehrte Expression der CINC-1- und CINC-3-Chemokine funktioniert auf folgendem Weg: IL-1 β wirkt u.a. über die Induktion der NF- κ B-Kaskade, wobei weitere

Transkriptionsfaktoren und STAT1 für die transkriptionelle Regulation von CINC-3 durch IL-1 β benötigt werden (164). IL-1 β führt zudem zu Änderungen in der Acetylierung und Methylierung des Histons der CINC-3-Promotoren, die beide zu einer Aktivierung der Transkription führen (164). Auch bei RA ist eine starke NF- κ B-Aktivierung zu finden, und dessen Hemmung zeigt in einem Carrageenan-induzierten Pleuritismodell bei Ratten eine Minderung der Immunzellinfiltration von 60% in das Exsudat (169).

CINC Proteine scheinen auch eine Rolle bei Diabetes mellitus Typ I zu spielen, einer Krankheit, bei der auch eine endokrine Drüse zunehmend durch Autoimmunreaktion insuffizient wird: Insulinomazellen von Ratten in Kultur, inkubiert mit 1ng/ml IL-1 β , zeigten bereits nach 30 Minuten Transkripte, die für CINC-1 und CINC-3 kodieren. Maximale Genexpressionsmuster von CINC-3 resultierten nach 3h und die CINC-3 Expression reagierte ebenfalls schon auf niedrigere Konzentrationen von IL-1 β (0,1ng/ml). Nach 6 h zeigte sich eine 464-fache Erhöhung der Proteinmenge von CINC-3 (164). Neutrophile sind an der β -Zelldestruktion am Pankreas beteiligt (170). Da adrenokortikale Zellen ebenfalls Zytokine produzieren können, u.a. auch IL-1 β -mRNA, und IL-1 β -Protein, ein bei RA wichtiges Zytokin, könnte hier die Brücke zur adrenalen Minderfunktion bei RA geschlagen werden (171).

Alleine die in dieser Arbeit beobachteten erhöhten Nebennierengewichte während der Arthritishochphase an Tag 28 (Abbildung 13) im Tiermodell reichen für diese Behauptung natürlich nicht aus. Man müsste in weiteren Experimenten ein mögliches Einwandern von Neutrophilen quantifizieren und hinsichtlich der Pathophysiologie einen eventuellen Einfluss von Neutrophilen zeigen.

Hingegen ist eine generelle pathophysiologische Komponente von CINC-Proteinen bei adjuvant induzierter Arthritis bereits bewiesen: Hier konnte durch Hemmung der CINC-Rezeptoren (CXCR1 & CXCR2) die Progression der Ödemzunahme der Pfoten vermindert werden und auch eine teilweise Blockade der Neutrophileninvasion beobachtet werden, wodurch die histologischen Knorpel- und Knochenerosionen verringert wurden (172).

Eine Osteomyelitis bei adjuvanter Arthritis wurde über eine Neutrophileninfiltration durch CINC-1 und TNF vermittelt, wobei die Inhibition der CINC-1-Expression die Entstehung der Osteomyelitis verhinderte (173).

Mäusen, denen subkutan hohe Konzentrationen IL-1 β appliziert wurden (50 μ g, physiologische Blutserumkonzentration: 256 \pm 28 pg/ml), zeigten in der histologischen Analyse der Nebennieren starke Auffälligkeiten. Bereits nach 2 h zeigten sich zunehmend Neutrophile in den Gefäßen der Nebennierenrinden. Nach 8 h und einer zweiten Injektion war eine weitere Infiltration von neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Des Weiteren gab es Hinweise auf zytoplasmatische Kondensation und Verlust an Lipiden der Epithelzellen des adrenalen Kortex. Durch weitere Injektionen zeigte sich eine weitere Aggravation der beschriebenen Phänomene, jedoch auch viele andere Organmanifestationen. Nach 170h und 12-14 Injektionen von 10 μ g-Dosen IL-1 β war die Neutrophilenmenge in der Nebennierenrinde minimal, das Zytoplasma zeigte sich aber weiter kondensiert und die Lipidvakuolen waren depletiert (174).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine evtl. Neutrophileninvasion in die Nebenniere bei RA dosis- und zeitabhängig geschehen könnte. Dass bisher keine nekrotischen Nebennieren oder Zellzerstörungen in der Nebenniere bei RA gefunden wurden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Neutrophile das Funktionsniveau der HPA-Achse in bisher unbekannter, subtilerer Weise modulieren könnten. So wurde aus Neutrophilen beim Hasen bereits Corticostatin I isoliert. Dieses corticostatische Peptid inhibiert die ACTH-Bindung an den Rezeptor (175). Corticostatine sind kompetitive Inhibitoren von ACTH, welche wahrscheinlich die Bindestelle des ACTH-Rezeptors für ACTH blockieren (176). In Neutrophilen sind hohe Mengen an Corticostatinen gefunden worden, woraus Zhu et al. folgern, dass Neutrophile auf diese Weise eine Rolle in der Regulation der immuno-endokrinen Interaktion einnehmen könnten (176).

4.6 Sauerstoffverbrauchsmessung

Um einen Parameter für das Funktionsniveau der Nebenniere zu finden, wurde mittels der Sauerstoffverbrauchsmessung ein indirekter Parameter für den Energieverbrauch vermutet. Der Messung des Sauerstoffverbrauchs liegt die Annahme zu Grunde, dass Zellen, die sich im Kulturmedium befinden, mit zunehmendem Sauerstoffverbrauch eine Minderung des im Medium gelösten Sauerstoffs verursachen. Die Konzentration und Änderung dieses im Medium befindlichen Sauerstoffs wurde gemessen (Abbildung 6). Wenn Zellen sensitiv auf ACTH oder IL-1 β reagieren, wird bei einer Hemmung/Förderung des Zellmetabolismus die Zunahme/Abnahme des gelösten Sauerstoffs detektiert (177). Diese Messung wurde für die weitere Objektivierung der relativen Nebenniereninsuffizienz unter arthritischen Bedingungen und des Einflusses von ACTH und IL-1 β auf die Nebenniere durchgeführt. Da ein großer Aufwand der glukokortikoidproduzierenden Zellen in der Steroidogenese liegt, wurde die Hypothese geprüft, ob ACTH oder IL-1 β durch Stimulation oder Hemmung der Corticosteronsynthese einen Sauerstoffmehrverbrauch oder eine Minderung des Sauerstoffverbrauchs hervorrufen (113).

Die alleinige Umwandlung von Cholesterol zu Corticosteron benötigt kaum ATP-Zufuhr sondern eine Zufuhr von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH (178, 179). Allerdings benötigt die *de-novo*-Synthese von Cholesterol und die Enzyminduktion durch ACTH viel Energie in Form von ATP. So wird die mRNA des Transportproteins StAR, welches am Anfang der Corticosteronsynthese aus Cholesterol steht, bereits nach 30 Minuten durch ACTH vermehrt exprimiert, entsprechend einer konsekutiven Steigerung der Proteinkonzentration (180).

ACTH-Stimulation von Nebennierenzellkulturen scheint keinen direkten Effekt auf die mitochondrialen Cytochrome der Atmungskette zu haben. Deren Menge bleibt durch ACTH-Stimulation unverändert (181). Der physiologische Plasma-ACTH-Spiegel von gesunden DA-Ratten ohne Arthritis liegt ungefähr bei 12,1pg/ml (113). Bei einem Molekulargewicht des ACTH der Ratte von ca. 4582 g/mol ergibt sich eine Plasma-ACTH-Konzentration von $2,64 \times 10^{-12}$ mol/l. Im vorliegenden Experiment wurden die Nebennieren mit einer ACTH-Konzentration von 10^{-7} mol/l stimuliert. Die Konzentrationserhöhung entspricht ca. dem Faktor 40000. Hierbei kann man jedoch nur an Versuchstag 5 eine Antwort auf ACTH im Sinne einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs erkennen (Abbildung 41). Diese Besonderheit könnte zum Teil

dadurch bedingt sein, dass selbst eine ACTH-Konzentration von 10^{-7} mol/l nicht die physiologische Konzentration in den Zielzellen der Nebennierenachtel erreicht hat, um einen klaren Effekt sichtbar zu machen. Es wäre möglich, dass ACTH ohne Organperfusion den Zellverbund der Nebennierenachtel interstitiell nicht penetrieren konnte. Für die Nullhypothese, dass ACTH keinen Sauerstoffmehrverbrauch auslöst, könnte sprechen, dass der Sauerstoffverbrauch zu wenig von der Corticosteronsynthese abhängig ist. Ein Fehler 2. Art (Beta-Fehler) könnte in diesem Modell dadurch zustande kommen, dass der basale Sauerstoffverbrauch der anderen im Medium enthaltenen Zellen (*Z. glomerulosa*, *Z. reticularis*, Medulla, Organkapsel) so prominent ist, dass vorhandene Änderungen durch ACTH- oder IL-1 β -Inkubation der Zellen der *Z. fasciculata* nicht mehr detektiert werden können und so maskiert werden.

Es könnte auch genügend ATP-Speicher vorrätig gewesen sein, um während der sechsständigen ACTH-Stimulation keine signifikante Nachproduktion mit dem damit verbundenen Sauerstoffverbrauch aufbringen zu müssen. Ebenso hätte gespeichertes Cholesterol aus den Lipidvakuolen freigesetzt werden können und somit kein signifikant erhöhter Sauerstoffverbrauch durch die energie- und somit sauerstoffintensive Cholesterol-Neogenese entstanden sein können.

Die hohe Streuung der Einzelwerte könnte dadurch zustande gekommen sein, dass das physikochemische System, in dem die Messungen stattfanden, durch die unvermeidliche Öffnung des Inkubators für die ACTH-Stimulation unterbrochen wurde und somit das Gleichgewicht dieses Systems empfindlich gestört wurde. Die Vergleichswerte wurden zwar erst in Bezug gesetzt, als das Medium die Temperaturgleichheit wieder erreicht hat, nichts desto trotz könnten andere Parameter (Druck, O₂-Konzentration, Lage der Nebennierenachtel) durch die Öffnung verschoben worden sein.

An keinem der untersuchten Tage konnte IL-1 β eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs auslösen (Abbildung 47). IL-1 β induzierte aber in der Nebenniere eine deutlich erhöhte Expression an CINC-1 und CINC-3 (Abbildung 22 bis Abbildung 39), die den Sauerstoffverbrauch für sich genommen hätte erhöhen müssen, denn die Knüpfung einer Peptidbindung benötigt ungefähr 5 ATP und die komplette Synthese eines typischen Proteins insgesamt ca. 2.300 ATP-Moleküle

(182). An Tag 55 zeigte sich jedoch eine IL-1 β -induzierte Minderung des Sauerstoffverbrauchs sowohl bei den Nebennieren der CIA-Tiere als auch der Kontrolltiere (Abbildung 45). Der Sauerstoffverbrauch der Nebennieren der CIA-Tiere wurde sogar trotz ACTH-Stimulation an diesem Tag durch IL-1 β gehemmt (Abbildung 45). Ein zur Minderung im Sauerstoffverbrauch passender Abfall der Corticosteronsynthese durch IL-1 β zeigt sich an Tag 55 (Abbildung 18).

So kann IL-1 β über die endogene Mehrproduktion von NO die mitochondriale Elektronentransportkette durch Hemmung der Komplexe I, II & III zumindest teilweise reversibel inhibieren (183) (184). IL-1 β minderte so an Rattenhepatozyten in Kultur den Sauerstoffverbrauch für die oxidative Phosphorylierung um ca. 32% (183). IL-1 β kann v.a. zeitabhängig nach mindestens 8h Inkubation von Hepatozyten die NO-Produktion signifikant steigern (185). Dieser Mechanismus wäre, auf die Nebenniere übertragen, auch denkbar und könnte so eine Teilerklärung für den IL-1 β induzierten gesenkten Sauerstoffverbrauch sein. Dieser niedrigere Sauerstoffverbrauch zeigte sich nur an den chronischen Arthritiszeitpunkten an Tag 55 und könnte auf eine vermehrte Suszeptibilität oder auch auf eine eventuell verminderte Eliminationsmöglichkeit gegenüber NO zurückzuführen sein. Hier muss man jedoch erwähnen, dass auch die unstimulierten Nebennieren der CIA-Tiere an Tag 55 einen Abfall im Sauerstoffverbrauch und eine Minderung in der Corticosteronsynthese erfuhren (Abbildung 18 und Abbildung 45).

Eine generelle Wirkung von IL-1 β auf die Nebennieren an allen untersuchten Tagen ließ sich ja durch die Erhöhung der CINC-1- und CINC-3-Expression feststellen (Abbildung 22 bis Abbildung 39). Hier könnte es ebenfalls möglich sein, dass die untersuchten Effekte auf den Sauerstoffverbrauch durch die Masse an anderen parallel laufenden, ebenfalls Sauerstoff verbrauchenden Stoffwechselvorgängen der restlichen Nebennierenzellen maskiert waren. Um hier exaktere Ergebnisse zu bekommen, müsste man in nachfolgenden Experimenten ausschließlich Zellen der *Z. fasciculata* oder sogar isolierte Mitochondrien dieser Zellen untersuchen. Generell muss man davon ausgehen, dass IL-1 β auch in viele andere Schritte des Zellmetabolismus bei den in der Nebenniere verschiedenen enthaltenen Zellen eingreift und evtl. durch Modulation anderer biochemischer Schritte zu verschiedenen Zeitpunkten deswegen kein konstanter Abfall im Sauerstoffverbrauch über alle Versuchstage zu detektieren war.

4.7 Elektronenmikroskopie

In vorhergehenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nebennierenrinde der Ratten bei Kollagen-induzierter Arthritis von Wolff et al. wurden unter den Zellorganellen Alterationen im Vergleich zu gesunden Tieren gefunden: In der Morphologie veränderte Mitochondrien wurden bei CIA-Tieren sechsmal häufiger vorgefunden als bei Kontrolltieren. Über die Beobachtungszeit von 55 Tagen nahm die Dichte der normalen Mitochondrien zu Gunsten der alterierten Organellen ab, wobei die Anzahl der normalen Mitochondrien jedoch positiv mit den Corticosteronspiegeln im Serum in allen untersuchten Tieren korrelierte (113).

Es wurde vermutet, dass gewisse subzelluläre Strukturen (Mitochondrien, Lipidvakuolen) zur relativen Nebenniereninsuffizienz beitragen, oder zumindest ein morphologischer Ausdruck dieser sind, denn die Dichte der veränderten Mitochondrien korrelierte negativ mit der Anzahl von inhomogenen Lipidtröpfchen, die als aktiviert gelten und somit einer Cholesterolfreisetzung unterliegen (113). Homogene Lipidvakuolen unterliegen jedoch keinem Lipidabbau. ACTH-Stimulation ging mit vermehrt inhomogenen Strukturen im Sinne einer Initiation der Corticosteronsynthese einher (113). Da die Lipidspeicher der adrenokortikalen Zellen während und nach der Hochphase der Arthritis (Tag 28-55) bei den CIA-Tieren signifikant gegenüber denen der Kontrolltiere erhöht waren und die Lipidvakuolen bei den CIA-Tieren im zeitlichen Verlauf vermehrt gefüllt vorlagen, entstand die Vermutung, dass die Cholesterolester im Sinne einer Rückstauung nicht aufgebraucht wurden und somit vermehrt in der Speicherform vorlagen (113).

Das sER, welches ebenfalls an der Corticosteronsynthese enzymatisch beteiligt ist, ist in der *Z. fasciculata* reichlich vorhanden und besteht aus kleinen Vesikeln und Tubuli (186). Betrachtet man in vorliegender Arbeit das Verhältnis von sER zu Zytoplasma, erkennt man, dass das Flächenverhältnis an Tag 1 und 5 nach Arthritisinduktion bei den Kontrolltieren höher ist. Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch an Tag 28, der Hochphase der Arthritis, um. An Tag 55 erkennt man keinen signifikanten Unterschied in der Ratio (Abbildung 53).

Aus diesen Verhältnissen könnte man schließen, dass zur Hochphase der Arthritis eine sER-Hypertrophie vorliegt. So kann das sER z.B. auch schon Volumenschwankungen bei Änderungen der Bedingungen der systemischen

Cholesterolfuhr durch cholesterinsenkende Medikamente oder Ischämie der kontralateralen Nebenniere zeigen (187) (188). Unter der Annahme, dass der Verlauf der Kontrolltiere physiologisch war, könnte die sER-Fläche der CIA-Tiere an Tag 28 eine relative Größenzunahme erfahren haben.

In einem Morbus Crohn-Tiermodell konnte man bei immunisierten Tieren nach bereits drei Tagen neben erhöhten Corticosteronwerten eine Hyperplasie und Hypervaskularisation der Nebennieren beobachten (126). Ebenso zeigten die Tiere mit Colitis erhöhte Zellvolumina, in Größe und Anzahl verminderte Liposomen, eine erhöhte Anzahl von vergrößerten Mitochondrien und dilatiertes sER (126).

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Aktivierung der Corticosteronsynthese die Lipidvakuolen der adrenokortikalen Zellen abnahmen (127) (189). Dieser Effekt scheint zeitabhängig zu sein, da v.a. kurzfristige ACTH-Stimulation die Lipidvakuolen leert, längerfristige Stimulation hingegen auch eine Zunahme der Lipidvakuolen bewirken kann (125). Die *Zona fasciculata*-Zellen scheinen auf diese Weise ein steady-state-Gleichgewicht auf hohem Aktivierungsniveau zu gewährleisten und für den künftigen Substratverbrauch die Lipidspeicher zu füllen. Eine Abnahme der reinen Zytoplasmafläche durch vergrößerte Mitochondrien und aufgestaute Lipidvakuolen, gepaart mit dilatiertem sER bei CIA-Tieren könnte, wie an Tag 28 beobachtet, das Flächenverhältnis umkehren. Die Ratio der Nebennieren der CIA-Tiere würde somit höher als die Ratio der Kontrolltiere werden (Abbildung 53). Eine solche Volumenzunahme der Mitochondrien kann sowohl durch Aktivierung durch die HPA-Achse entstehen oder durch Rückstau von Zwischenstufen von Steroiden der Steroidsynthese (127) (190) (191).

Ein bereits von Wolff et al. beschriebener, im Zeitverlauf einem Rückstau ähnelnder Effekt, wurde ja bereits für die Lipidspeicher und auch für Mitochondrien der adrenokortikalen Zellen bei CIA-Tieren publiziert (113). Der letzte Syntheseschritt, welcher enzymatisch aus Deoxycorticosteron Corticosteron herstellt, wird durch die 11 β -Hydroxylase Typ 2 katalysiert, welche sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet (192) (Abbildung 4). Eine Malfunktion durch Hemmung oder Minderexpression könnte ihr Substrat im Mitochondrium unbemerkt aufstauen.

Ebenso induzierte in einer Publikation die Gabe von Aminoglutethimid, welches Schritte der Corticosteronbiosynthese hemmt, eine signifikante Zunahme des

Mitochondrienvolumens, des sER und v.a. der Lipidtröpfchen, während die Corticosteronsekretion abfiel (193). Da auch die Cholesterolkonzentration in den Nebennierenzellen dadurch zunahm, könnte es sich um einen Stauungseffekt handeln. Erklärbar wären diese Volumenzunahmen auch, wie der Autor meinte, durch eine möglicherweise vermehrte ACTH-Einwirkung durch Abnahme des negativen Feedbacks durch Corticosteron (193). In Zusammenschau mit den nicht erfolgten Erhöhungen der Corticosteronwerte im Plasma (Abbildung 15) und im Überstand nach ACTH-Stimulation (Abbildung 16 bis Abbildung 21) in vorliegender Arbeit verfestigt somit sich die These einer relativen Nebenniereninsuffizienz.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine relative Nebenniereninsuffizienz an durch Kollagen II immunisierten und arthritischen Ratten gezeigt werden. Diese konnten hierbei trotz erhöhtem relativen Nebennierengewicht keine höheren Plasmacorticosteronkonzentrationen als gesunde Tiere aufbauen. *In vitro* zeigten die Nebennieren im Gewebeverbund einen zeitabhängigen Effekt auf IL-1 β -Stimulation, während ACTH keine Corticosteronsekretion induzieren konnte. So konnte IL-1 β nur anfangs (Tag 5) die Corticosteronsekretion bei CIA-Tieren stimulieren. IL-1 β vermochte ebenso erst zu späteren Versuchszeitpunkten (Tag 55) den Sauerstoffverbrauch der Nebennieren zu senken. Es wurde nachgewiesen, dass ACTH- und IL-1 β -Inkubation die Nebennieren zu vermehrter Zytokinproduktion veranlasst. Hier fiel v.a. eine starke Zunahme der Proteinexpression von CINC-1 und CINC-3 unter IL-1 β -Stimulation sowohl bei CIA- als auch bei Kontrolltieren auf. Auf ultrastruktureller Ebene zeigte sich während der Hochphase der Arthritis an Tag 28 eine Verhältnismkehr von sER zu Zytoplasma zu Gunsten der CIA-Tiere. Es liegt eine relative Nebenniereninsuffizienz vor.

Um sicherzustellen, dass die ACTH- und IL-1 β -Stimulation tatsächlich alle Zellen im Gewebeverbund der Nebennieren erreicht, könnte man den Versuch unter Messung des Sauerstoffverbrauchs noch einmal unter sichergestellter Perfusion der Organe durchführen. Bei folgenden Forschungen wäre interessant, in welchem Ausmaß IL-1 β während experimenteller Arthritis *in vivo* in den Nebennieren die Expression von CINC-Proteinen erhöht. Ob und zu welchem Zeitpunkt bei experimenteller Arthritis Neutrophile diesem chemotaktischen Faktor nachkommen und welchen Einfluss diese auf die Glukokortikoidproduktion ausüben könnten, bleibt ein offenes und spannendes Forschungsfeld. Um eine exaktere Verbindung der Darstellung der Zellorganellen im EM mit der Glukokortikoidsynthese herzustellen, müsste man die Zwischenmetabolite der Steroidogenese und die Enzymexpression messen. Dadurch könnte man exakter bestimmen ob und welche Syntheseschritte für die Minderproduktion von Glukokortikoiden im Verhältnis zur Entzündung verantwortlich sind. Ebenso könnte man weitere Zytokine genauer auf deren Expressionszunahme unter CIA-Bedingungen oder nach IL-1 β -Inkubation testen, um evtl. das Protein zu bestimmen, welches an der Vermittlung der relativen Nebenniereninsuffizienz bei RA hauptsächlich beteiligt ist.

Literaturverzeichnis

1. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009; 11(3):229.
2. Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. 2015th ed. Köln: Herold; 2015.
3. Egerer K, Feist E, Burmester G. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Deutsches Ärzteblatt international* 2009; 106(10):159–63.
4. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2006; 36(3):182–8.
5. Arastéh K, Baenkler H. Innere Medizin. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2013. (Duale Reihe).
6. Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Junker P, Christensen K, Christiansen L et al. On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes--a population based twin study. *PloS one* 2013; 8(2):e57304.
7. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism* 2000; 43(1):30–7.
8. Frisell T, Holmqvist M, Kallberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis and rheumatism* 2013; 65(11):2773–82.
9. Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 45(2):170–9.
10. Alvarez I, Collado J, Daura X, Colomé N, Rodríguez-García M, Gallart T et al. The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its

repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis and rheumatism* 2008; 58(6):1630–9.

11. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452(2):254–62.

12. Jawaheer D, Thomson W, MacGregor AJ, Carthy D, Davidson J, Dyer PA et al. "Homozygosity" for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. *Arthritis and rheumatism* 1994; 37(5):681–6.

13. Straub RH. *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2006-2007. (Psycho-Neuro-Endokrino-Immunologie).

14. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 2002; 63(11):1039–44.

15. van der Helm-van Mil, Annette H M, Huizinga, Tom W J, Schreuder, Geziena M Th, Breedveld FC, de Vries, René R P, Toes, René E M. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis and rheumatism* 2005; 52(9):2637–44.

16. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(3):141–53.

17. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34(4):395–402.

18. Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutierrez-Achury J, Do R, Voight BF et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 2012; 44(5):483–9.

19. Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Annals of the rheumatic diseases* 2004; 63 Suppl 2:ii46-ii49.

20. Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013.
21. Tiwana H, Wilson C, Alvarez A, Abuknesha R, Bansal S, Ebringer A. Cross-Reactivity between the Rheumatoid Arthritis-Associated Motif EQKRAA and Structurally Related Sequences Found in *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 1999; 67(6):2769–75.
22. Heliovaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993; 20(11):1830–5.
23. Criswell LA, Merlino LA, Cerhan JR, Mikuls TR, Mudano AS, Burma M et al. Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study. *Am J Med* 2002; 112(6):465–71.
24. Damgaard D, Friberg Bruun Nielsen M, Quisgaard Gaunsbaek M, Palarasah Y, Svane-Knudsen V, Nielsen CH. Smoking is associated with increased levels of extracellular peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in the lungs. *Clinical and experimental rheumatology* 2015; 33(3):405–8.
25. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2004; 50(10):3085–92.
26. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Annals of the rheumatic diseases* 2003; 62(9):835–41.
27. Masdottir B, Jonsson T, Manfredsdottir V, Vikingsson A, Brekkan A, Valdimarsson H. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2000; 39(11):1202–5.
28. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Annals of the rheumatic diseases* 1997; 56(8):463–9.

29. Manfredsdottir VF, Vikingsdottir T, Jonsson T, Geirsson AJ, Kjartansson O, Heimisdottir M et al. The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2006; 45(6):734–40.
30. Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL, Dugowson CE, Daling JR. Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 1994; 5(5):525–32.
31. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis and rheumatism* 1997; 40(11):1955–61.
32. Crowson CS, Matteson EL, Davis JM, Gabriel SE. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65(1):71–7.
33. Persselin JE. Diagnosis of rheumatoid arthritis. Medical and laboratory aspects. *Clin Orthop Relat Res* 1991; (265):73–82.
34. Grassi W, Angelis R de, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 1998; 27 Suppl 1:S18-24.
35. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012; 18(13 Suppl):S295-302.
36. Gabriel SE. Why do people with rheumatoid arthritis still die prematurely? *Annals of the rheumatic diseases* 2008; 67 Suppl 3:30–4.
37. Davis JM, Roger VL, Crowson CS, Kremers HM, Thorneau TM, Gabriel SE. The presentation and outcome of heart failure in patients with rheumatoid arthritis differs from that in the general population. *Arthritis and rheumatism* 2008; 58(9):2603–11.
38. Nicola PJ, Maradit-Kremers H, Roger VL, Jacobsen SJ, Crowson CS, Ballman KV et al. The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a population-based study over 46 years. *Arthritis and rheumatism* 2005; 52(2):412–20.
39. Lassere MN, Rappo J, Portek IJ, Sturgess A, Edmonds JP. How many life years are lost in patients with rheumatoid arthritis? Secular cause-specific and all-cause

mortality in rheumatoid arthritis, and their predictors in a long-term Australian cohort study. *Internal medicine journal* 2013; 43(1):66–72.

40. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2007; 46(2):350–7.

41. Engvall I, Elkan A, Tengstrand B, Cederholm T, Brismar K, Hafstrom I. Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor. *Scand J Rheumatol* 2008; 37(5):321–8.

42. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford, England)* 2004; 43(10):1219–23.

43. Katz P, Margaretten M, Trupin L, Schmajuk G, Yazdany J, Yelin E. Sleep disturbance, depression, obesity, and physical inactivity explain a significant portion of fatigue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015.

44. Nikolaus S, Bode C, Taal E, van de Laar, Mart A F J. Fatigue and factors related to fatigue in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65(7):1128–46.

45. Kvien TK. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics* 2004; 22(2 Suppl 1):1–12.

46. Lin M, Guo H, Lu M, Livneh H, Lai N, Tsai T. Increased risk of depression in patients with rheumatoid arthritis: a seven-year population-based cohort study. *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 70(2):91–6.

47. Isik A, Koca SS, Ozturk A, Mermi O. Anxiety and depression in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26(6):872–8.

48. March L, Lapsley H. What are the costs to society and the potential benefits from the effective management of early rheumatoid arthritis? Best practice & research. *Clinical rheumatology* 2001; 15(1):171–85.

49. Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T, Girard P, Bouvier M, Lejeune E et al. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 1987; 46(1):65–71.

50. Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis Markers* 2013; 35(6):727–34.
51. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort, E A, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(9):1029–35.
52. Panayi GS. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44 Suppl 2:ii3-ii7.
53. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146(11):797–808.
54. Makrygiannakis D, Klint Ea, Lundberg IE, Löfberg R, Ulfgren A, Klareskog L et al. Citrullination is an inflammation-dependent process. *Annals of the rheumatic diseases* 2006; 65(9):1219–22.
55. Farid SS, Azizi G, Mirshafiey A. Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2013; 16(4):379–86.
56. Bläss S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences. *Zeitschrift für Rheumatologie*; 2001(60):1–16.
57. Vossenaar ER, Zendman, Albert J W, van Venrooij, Walther J, Pruijn, Ger J M. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003; 25(11):1106–18.
58. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij, Walther J. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2004; 6(1):1–5.
59. Rassow J. *Biochemie: 67 Tabellen. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe).
60. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen. 31.th ed.* [S.I.]: Springer-Verlag Berlin He; 2011.
61. Meier, Florian M P, Frerix M, Hermann W, Muller-Ladner U. Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. *Immunotherapy* 2013; 5(9):955–74.

62. Deller T, Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban et Fischer; 2010.
63. Koizumi F, Matsuno H, Wakaki K, Ishii Y, Kurashige Y, Nakamura H. Synovitis in rheumatoid arthritis: scoring of characteristic histopathological features. *Pathol Int* 1999; 49(4):298–304.
64. Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 2005; 12(3):183–9.
65. Scrivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108:312–22.
66. Cutolo M, Sulli A, Villaggio B, Serio B, Accardo S. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1998; 57(10):573–7.
67. Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A et al. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(3):202–13.
68. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG et al. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10):1748–59.
69. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350(25):2572–81.
70. Nardella FA, Dayer JM, Roelke M, Krane SM, Mannik M. Self-associating IgG rheumatoid factors stimulate monocytes to release prostaglandins and mononuclear cell factor that stimulates collagenase and prostaglandin production by synovial cells. *Rheumatol Int* 1983; 3(4):183–6.
71. Roelofs MF, Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout, A W T, Sprong T, van den Hoogen, F H et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3,

4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52(8):2313–22.

72. Fassbender HG, Simmling-Annefeld M. The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis. *J Pathol* 1983; 139(3):399–406.

73. Boots AM, Wimmers-Bertens AJ, Rijnders AW. Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology* 1994; 82(2):268–74.

74. Scott BB, Weisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CJ, Keystone EC. Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 1997; 40(3):490–8.

75. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44(5):1003–12.

76. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 2001; 344(12):907–16.

77. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews* 2010; 233(1):233–55.

78. Kammouni W, Wong K, Ma G, Firestein GS, Gibson SB, El-Gabalawy HS. Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis and rheumatism* 2007; 56(9):2854–63.

79. Mueller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 149(5):1607–15.

80. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature medicine* 2009; 15(12):1414–20.

81. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and

tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *The Journal of biological chemistry* 1990; 265(28):17238–45.

82. Alexopoulou L, Pasparakis M, Kollias G. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur J Immunol* 1997; 27(10):2588–92.

83. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* 1991; 21(10):2575–9.

84. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; 10(13):4025–31.

85. Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis and rheumatism* 2002; 46(3):802–5.

86. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation* 1999; 103(9):1345–52.

87. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases* 2013; 72 Suppl 2:ii116-23.

88. Kunwar S, Dahal K, Sharma S. Anti-IL-17 therapy in treatment of rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology international* 2016; 36(8):1065–75.

89. Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:307–38.

90. Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum* 2001; 44(3):493–507.

91. Boyle DL, Sajjadi FG, Firestein GS. Inhibition of synoviocyte collagenase gene expression by adenosine receptor stimulation. *Arthritis Rheum* 1996; 39(6):923–30.

92. Kreckler LM, Wan TC, Ge Z, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317(1):172–80.
93. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866):916–20.
94. Baerwald CG, Laufenberg M, Specht T, Wichert Pv, Burmester GR, Krause A. Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *Rheumatology* 1997; 36(12):1262–9.
95. Dirmeier M, Capellino S, Schubert T, Angele P, Anders S, Straub RH. Lower density of synovial nerve fibres positive for calcitonin gene-related peptide relative to substance P in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2008; 47(1):36–40.
96. Miller LE, Jüsten H, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000; 14(13):2097–107.
97. Laurenzi MA, Persson MA, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scandinavian journal of immunology* 1990; 31(4):529–33.
98. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226(4674):547–9.
99. Cutolo M, Villaggio B, Foppiani L, Briata M, Sulli A, Pizzorni C et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:835–43.
100. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of

testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis & Rheumatism* 1988; 31(10):1314–7.

101. Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966:166–86.

102. Straub RH, Besedovsky HO. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J* 2003; 17(15):2176–83.

103. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2003; 30(12):2597–605.

104. Carroll JA, Willard ST, Bruner BL, McArthur NH, Welsh, T H Jr. Mifepristone modulation of ACTH and CRH regulation of bovine adrenocorticosteroidogenesis in vitro. *Domest Anim Endocrinol* 1996; 13(4):339–49.

105. Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M. Inadequately Low Serum Levels of Steroid Hormones in Relation to Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor in Untreated Patients With Early Rheumatoid Arthritis and Reactive Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2002; (Volume 46, Issue 3).

106. Mastorakos G, Ilias I. Relationship between interleukin-6 (IL-6) and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2000; 59 Suppl 2:II/75-9.

107. Chikanza IC, Petrou P, Kingsley G, Chrousos G, Panayi GS. Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35(11):1281–8.

108. Templ E, Koeller M, Riedl M, Wagner O, Graninger W, Luger A. Anterior Pituitary Function in Patients with Newly Diagnosed Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology* 1996; 35(4):350–6.

109. Eijsbouts AMM, van den Hoogen FH, Laan R, Hermus A, Sweep C, van de Putte L. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23(5):658–64.

110. Harbuz MS, Conde GL, Marti O, Lightman SL, Jessop DS. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1997; 823(1 Neuropsychiat):214–24.
111. Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS et al. Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):1279–83.
112. Persellin RH, Kittinger GW, Kendall JW. Adrenal response to experimental arthritis in the rat. *Am J Physiol* 1972; 222(6):1545–9.
113. Wolff C, Krinner K, Schroeder JA, Straub RH. Inadequate corticosterone levels relative to arthritic inflammation are accompanied by altered mitochondria/cholesterol breakdown in adrenal cortex: a steroid-inhibiting role of IL-1beta in rats. *Ann Rheum Dis* 2014.
114. Jessop DS, Harbuz MS. A defect in cortisol production in rheumatoid arthritis: why are we still looking? *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(9):1097–100.
115. Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* 1998; 139(6):2863–8.
116. Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991; 128(1):623–9.
117. Calkins JH, Guo H, Sigel MM, Lin T. Differential effects of recombinant interleukin-1 alpha and beta on Leydig cell function. *Biochemical and biophysical research communications* 1990; 167(2):548–53.
118. Presens GmbH. SDR: O2/pH Monitoring in Multidishes - PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland: Presens GmbH [cited 2016 Feb 2]. Available from:

URL:<http://www.presens.de/products/brochures/category/systems/brochure/sdr-sensordish-reader.html#tab-probes>.

119. Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J et al. Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunological reviews* 2001; 184(1):184–202.
120. Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiology & behavior* 2010; 100(5):478–89.
121. Ramos EJB, Suzuki S, Marks D, Inui A, Asakawa A, Meguid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2004; 7(4):427–34.
122. Garcia-Herrera J, Navarro MA, Marca MC, La Osada J de, Rodriguez-Yoldi MJ. The effect of tumor necrosis factor-alpha on D-fructose intestinal transport in rabbits. *Cytokine* 2004; 25(1):21–30.
123. Santilli V, Bernetti A, Mangone M, Paoloni M. Clinical definition of sarcopenia. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* 2014; 11(3):177–80.
124. Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *Journal of internal medicine* 2010; 267(6):543–60.
125. Andreis PG, Rebuffat P, Belloni AS, Neri G, Cavallini L, Gottardo G et al. Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells: zona fasciculata/reticularis cells of chronically ACTH-treated rats. *Cell and tissue research* 1989; 258(1):43–51.
126. Franchimont D, Bouma G, Galon J, Wolkersdorfer GW, Haidan A, Chrousos GP et al. Adrenal cortical activation in murine colitis. *Gastroenterology* 2000; 119(6):1560–8.
127. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Robba C, Gottardo G, Nussdorfer GG. Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona glomerulosa of the rat. A coupled stereological and enzymological study. *Cell and tissue research* 1986; 243(2):303–10.

128. Nussdorfer GG. Effects of corticosteroid-hormones on the smooth endoplasmic reticulum of rat adrenocortical cells. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* (Vienna, Austria : 1948) 1970; 106(1):143–54.
129. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 1998; 19(2):101–43.
130. Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81(13):4174–7.
131. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell and tissue research* 1994; 278(2):201–5.
132. Klein, JR. The immune system as a regulator of thyroid hormone activity. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 2006; 231(3):229–36.
133. Klein, JR, Wang HC. Characterization of a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells: potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis. *The Journal of experimental biology* 2004; 207(Pt 1):55–65.
134. del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolph A, Straub RH, Besedovsky HO. When Immune-Neuro-Endocrine Interactions Are Disrupted: Experimentally Induced Arthritis as an Example. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17(3):165–8.
135. Bornstein SR, Rutkowski H. The adrenal hormone metabolism in the immune/inflammatory reaction. *Endocrine research* 2002; 28(4):719–28.
136. Straub RH, Buttgereit F, Cutolo M. Alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in systemic immune diseases - a role for misguided energy regulation. *Clinical and experimental rheumatology* 2011; 29(5 Suppl 68):S23-31.
137. Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917:608–17.
138. Verhoeven G, Cailleau J, van Damme J, Billiau A. Interleukin-1 stimulates steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 57(1-2):51–60.

139. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Exp Biol Med* (Maywood) 2000; 223(1):22–38.
140. Mazzocchi G, Musajo FG, Malendowicz LK, Andreis PG, Nussdorfer GG. Interleukin-1 β Stimulates Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and Adrenocorticotropin (ACTH) Release by Rat Adrenal Gland in Vitro. *Mol Cell Neurosci* 1993; 4(3):267–70.
141. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G et al. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clinical and experimental immunology* 1995; 99(1):137–41.
142. Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M et al. Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology* 1991; 128(1):526–31.
143. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 215(1-2):135–41.
144. Sato T. Class II MHC-expressing cells in the rat adrenal gland defined by monoclonal antibodies. *Histochemistry and cell biology* 1998; 109(4):359–67.
145. Whitcomb RW, Linehan WM, Wahl LM, Knazek RA. Monocytes stimulate cortisol production by cultured human adrenocortical cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1988; 66(1):33–8.
146. Harlin CA, Parker CR, JR. Investigation of the effect of interleukin-1 β on steroidogenesis in the human fetal adrenal gland. *Steroids* 1991; 56(2):72–6.
147. Gwosdow AR, Kumar MS, Bode HH. Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *The American journal of physiology* 1990; 258(1 Pt 1):E65-70.
148. Lin T, Wang TL, Nagpal ML, Calkins JH, Chang WW, Chi R. Interleukin-1 inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* 1991; 129(3):1305–11.

149. Ogilvie KM, Held Hales K, Roberts ME, Hales DB, Rivier C. The inhibitory effect of intracerebroventricularly injected interleukin 1beta on testosterone secretion in the rat: role of steroidogenic acute regulatory protein. *Biology of reproduction* 1999; 60(2):527–33.
150. Tkachenko IV, Jaaskelainen T, Jaaskelainen J, Palvimo JJ, Voutilainen R. Interleukins 1alpha and 1beta as regulators of steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells. *Steroids* 2011; 76(10-11):1103–15.
151. Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of reproductive immunology* 2003; 58(1):1–26.
152. Wolff C, Straub RH, Hahnel A, Randolph A, Wildmann J, Besedovsky HO et al. Mimicking disruption of brain-immune system-joint communication results in collagen type II-induced arthritis in non-susceptible PVG rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 415:56–63.
153. Haas CS, Creighton CJ, Pi X, Maine I, Koch AE, Haines GK et al. Identification of genes modulated in rheumatoid arthritis using complementary DNA microarray analysis of lymphoblastoid B cell lines from disease-discordant monozygotic twins. *Arthritis and rheumatism* 2006; 54(7):2047–60.
154. Olsen N, Sokka T, Seehorn CL, Kraft B, Maas K, Moore J et al. A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Annals of the rheumatic diseases* 2004; 63(11):1387–92.
155. Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 2013; 440(2):265–70.
156. Cherkasova OP, Selyatitskaya VG, Pal'chikova NA, Kuznetsova NV. Activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal glands, liver, and kidneys of rats with experimental diabetes. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2014; 158(2):185–7.
157. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to

activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2001; 16(6):1037–44.

158. Shibata F, Konishi K, Nakagawa H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). *Cytokine* 2000; 12(9):1368–73.

159. Campbell SJ, Wilcockson DC, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC. Altered chemokine expression in the spinal cord and brain contributes to differential interleukin-1 β -induced neutrophil recruitment. *Journal of neurochemistry* 2002; 83(2):432–41.

160. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2002; 42:469–99.

161. Shibata F, Konishi K, Kato H, Komorita N, Al-Mokdad M, Fujioka M et al. Recombinant Production and Biological Properties of Rat Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractants, GRO/CINC-2 α , CINC-2 β and CINC-3. *European Journal of Biochemistry* 1995; 231(2):306–11.

162. Takano K, Nakagawa H. Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* 2001; 50(10):503–8.

163. Driscoll KE, Hassenbein DG, Howard BW, Isfort RJ, Cody D, Tindal MH et al. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; (58(3)):359–64.

164. Burke SJ, Lu D, Sparer TE, Masi T, Goff MR, Karlstad MD et al. NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 2014; 306(2):E131-E149.

165. Watanabe K, Suematsu M, Iida M, Takaishi K, Iizuka Y, Suzuki H et al. Effect of rat CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, on leukocytes in microcirculation of the rat mesentery. *Experimental and Molecular Pathology* 1992; 56(1):60–9.

166. Feng L, Xia Y, Yoshimura T, Wilson CB. Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *The Journal of clinical investigation* 1995; 95(3):1009–17.
167. Watanabe K, Kinoshita S, Nakagawa H. Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). *Biochemical and biophysical research communications* 1989; 161(3):1093–9.
168. H Nakagawa, N Komorita, F Shibata, A Ikesue, K Konishi, M Fujioka, H Kato. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 alpha and CINC-2 beta, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. *Biochemical Journal* 1994; 301(Pt 2):545.
169. Blackwell NM, Sembi P, Newson JS, Lawrence T, Gilroy DW, Kabouridis PS. Reduced infiltration and increased apoptosis of leukocytes at sites of inflammation by systemic administration of a membrane-permeable IkappaBalpha repressor. *Arthritis and rheumatism* 2004; 50(8):2675–84.
170. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine* 2013; 19(1):65–73.
171. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein, SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G et al. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clinical and experimental immunology* 1995; 99(1):137–41.
172. Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *British journal of pharmacology* 2008; 153(5):992–1002.
173. Tanahashi M, Koike J, Kawabe N, Nakadate-Matsushita T. Inhibitory effect of TRK-530 on inflammatory cytokines in bone marrow of rats with adjuvant arthritis. *Pharmacology* 1998; 56(5):237–41.
174. Butler LD, Layman NK, Cain RL, Riedl PE, Mohler KM, Bobbitt JL et al. Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of

histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clinical immunology and immunopathology* 1989; 53(3):400–21.

175. Solomon S, Hu J, Zhu Q, Belcourt D, Bennett HP, Bateman A et al. Corticostatic peptides. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1991; 40(1-3):391–8.

176. Zhu Q, Bateman A, Singh A, Solomon S. Isolation and biological activity of corticostatic peptides (anti-ACTH). *Endocrine research* 1989; 15(1-2):129–49.

177. Ishikawa T, Zhu BL, Maeda H. Effects of therapeutic agents on cellular respiration as an indication of metabolic activity. *Human & experimental toxicology* 2006; 25(3):135–40.

178. Lieberman S, Lin YY. Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc). *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2001; 78(1):1–14.

179. Estabrook RW. Steroid hydroxylations: a paradigm for cytochrome P450 catalyzed mammalian monooxygenation reactions. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 338(1):290–8.

180. Lehoux JG, Fleury A, Ducharme L. The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. *Endocrinology* 1998; 139(9):3913–22.

181. Kowal J, Simpson ER, Estabrook RW. Adrenal cells in tissue culture. V. On the specificity of the stimulation of 11 β -hydroxylation by adrenocorticotropin. *The Journal of biological chemistry* 1970; 245(9):2438–43.

182. Princiotta MF, Finzi D, Qian S, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F et al. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003; 18(3):343–54.

183. Berthiaume F, MacDonald AD, Kang YH, Yarmush ML. Control analysis of mitochondrial metabolism in intact hepatocytes: effect of interleukin-1 β and interleukin-6. *Metabolic engineering* 2003; 5(2):108–23.

184. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1411(2-3):351–69.

185. Tu W, Kitade H, Kaibori M, Nakagawa M, Inoue T, Kwon AH et al. An enhancement of nitric oxide production regulates energy metabolism in rat hepatocytes after a partial hepatectomy. *Journal of hepatology* 1999; 30(5):944–50.
186. Kadioglu D, Harrison RG. The functional relationships of mitochondria in the rat adrenal cortex. *J Anat* 1971; 110(Pt 2):283–96.
187. Mazzocchi G, Robba C, Meneghelli V, Nussdorfer GG. Long term effects of the hypocholesterolaemic drug 4-aminopyrazolo-pyrimidine on the zona fasciculata of the rat adrenal cortex. *Journal of Anatomy* 1986; 149:1–9.
188. Cakmak M, Kanmaz T, Mete UO, Tap O, Kaya M, Dindar H et al. Ultrastructural and hormonal changes in the contralateral adrenal gland in unilateral adrenal gland ischemia: an experimental study in rats. *Surgery today* 1998; 28(9):907–14.
189. Tortorella C, Guidolin D, Petrelli L, de Toni R, Milanesi O, Ruga E et al. Prolonged zidovudine administration induces a moderate increase in the growth and steroidogenic capacity of the rat adrenal cortex. *International journal of molecular medicine* 2009; 23(6):799–804.
190. Nickerson PA. Quantitative study on the effect of an ACTH-producing pituitary tumor on the ultrastructure of the mouse adrenal gland. *The American journal of pathology* 1975; 80(2):295–308.
191. Nussdorfer GG, Robba C, Mazzochi G, Rebuffat P. Effects of angiotensin II on the zona fasciculata of the rat adrenal cortex: an ultrastructural stereologic study. *Journal of Anatomy* 1981; 132(Pt 2):235–42.
192. Ishimura K, Fujita H. Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microscopy research and technique* 1997; 36(6):445–53.
193. Robba C, Mazzocchi G, Nussdorfer GG. Effects of a prolonged treatment with aminoglutethimide on the zona fasciculata of rat adrenal cortex: a morphometric investigation. *Cell and tissue research* 1987; 248(3):519–25.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung von citrullinierten Autoantikörpern	10
Abbildung 2: Beteiligte Komponenten an der Gelenkdestruktion	15
Abbildung 3: HPA- und HANS-Achse während RA	20
Abbildung 4: Schritte der Steroidhormonsynthese	23
Abbildung 5: schematische Darstellung der HPA-Achse	26
Abbildung 6: Funktionsweise der Sauerstoffmessung	37
Abbildung 7: Belegungsplan der OxoDish 24-well Platten	39
Abbildung 8: Stimulationsschema der Nebennieren während der Sauerstoffmessung	40
Abbildung 9: Ermittlung der Zytoplasmafläche	48
Abbildung 10: Ermittlung der sER-Fläche	49
Abbildung 11: Verlauf klinischer Arthritiscore	52
Abbildung 12: Gewichtsverlauf	52
Abbildung 13: Absolutwerte der Nebennierengewichte in mg	53
Abbildung 14: Ratio aus Nebennierengewicht in mg / Körpergewicht in mg....	54
Abbildung 15: Plasmacorticosteronkonzentration in Relation zum Gewicht der Nebennieren	55
Abbildung 16: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5	56
Abbildung 17: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28	57
Abbildung 18: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55	58
Abbildung 19: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation	59
Abbildung 20: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL- 1 β -Stimulation	60

Abbildung 21: Corticosteron-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH+IL-1β-Stimulation	61
Abbildung 22: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 1	62
Abbildung 23: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5	63
Abbildung 24: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 14	64
Abbildung 25: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28	65
Abbildung 26: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 40	66
Abbildung 27: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55	67
Abbildung 28: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation	68
Abbildung 29: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL-1β-Stimulation	69
Abbildung 30: CINC-1-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ATH+IL-1β-Stimulation	70
Abbildung 31: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 1	71
Abbildung 32: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 5	72
Abbildung 33: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 14	73
Abbildung 34: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 28	74
Abbildung 35: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 40	75
Abbildung 36: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren an Tag 55	76
Abbildung 37: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH-Stimulation	77
Abbildung 38: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter IL-1β-Stimulation	78
Abbildung 39: CINC-3-Sekretion der explantierten Nebennieren unter ACTH+IL-1β-Stimulation	79
Abbildung 40: Sauerstoffverbrauch an Tag 1	80
Abbildung 41: Sauerstoffverbrauch an Tag 5	81

Abbildung 42: Sauerstoffverbrauch an Tag 14	82
Abbildung 43: Sauerstoffverbrauch an Tag 28	83
Abbildung 44: Sauerstoffverbrauch an Tag 40	84
Abbildung 45: Sauerstoffverbrauch an Tag 55	85
Abbildung 46: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter ACTH-Stimulation	86
Abbildung 47: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter IL-1β-Stimulation	87
Abbildung 48: Sauerstoffverbrauch der Nebennieren unter ACTH+IL-1β-Stimulation	88
Abbildung 49: Zytokinprofil (I).....	89
Abbildung 50: Zytokinprofil (II).....	90
Abbildung 51: Zytokinprofil (III).....	91
Abbildung 52: Zytokinprofil (IV)	92
Abbildung 53: Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder: Ratio sER/Zytoplasma.....	93

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Martin Lesiak, geboren am 23.05.1990 in Augsburg erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 21.06.2018

Martin Lesiak

Danksagung

Mein Dank geht an alle, die mich während meiner Promotion unterstützt haben, im Besonderen an:

Dr. Hubert Stangl: Für die Betreuung und Korrektur meiner Dissertation, die intensive, kritische und stetige Beratung bei der Erstellung der Arbeit, so wie seine Erreichbarkeit zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Dr. Christine Wolff: Für das Erwählen des Themas und die Einarbeitung in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Heiko Ingo Siegmund: Für die überaus rasche und zuverlässige Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder und die freundliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Rainer H. Straub: Für die Überlassung des Themas, die gute Kooperation und die konstruktive Kritik während der Entwicklung dieser Arbeit, sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

